

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 9 月 7 日 (07.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 01/64862 A1**

(51) 国際特許分類: **C12N 15/09**,  
1/21, 5/10, C07K 16/28, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P  
43/00, 9/10, 7/02, 7/04, 13/12, 9/10, 29/00

内 Kanagawa (JP). 沢村達也 (SAWAMURA, Tatsuya)  
[JP/JP]; 〒606-8224 京都府京都市左京区北白川追分  
町80-1-208 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01636

(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2001 年 3 月 2 日 (02.03.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-57745 2000 年 3 月 2 日 (02.03.2000) JP  
特願2000-333116  
2000 年 10 月 31 日 (31.10.2000) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アブジェ  
ニックス インコーポレイテッド (ABGENIX, INC.)  
[US/US]; 94555 カリフォルニア州 フレモント ダム  
バートン サークル 7601 California (US).

(72) 発明者; および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林祐子  
(KOBAYASHI, Yuko) [JP/JP]. 辻 宏幸 (TSUJI, Hi-  
royuki) [JP/JP]. 鎌田 雅史 (KAMADA, Masafumi)  
[JP/JP]; 〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦  
1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL RECEPTOR AND MEDICINAL USE  
THEREOF

(54) 発明の名称: 酸化LDL受容体に対するヒトモノクローナル抗体及びその医薬用途

(57) Abstract: Various human monoclonal antibodies, which bind to human LOX-1 and thus inhibit the binding of LOX-1 to ligands  
in vivo and incorporation of these ligands into cells mediated by LOX-1, are obtained by immunizing human antibody-producing  
transgenic mice constructed by using genetic engineering techniques with soluble human oxidized LDL receptor (LOX-1). It is also  
found out that these monoclonal antibodies are efficacious in preventing and treating various diseases.

(57) 要約:

遺伝子工学技術を用いて作製したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに可  
溶性ヒト酸化 LDL 受容体 (LOX-1) を免疫することにより、ヒト LOX-1 に結合し、  
LOX-1 の生体内リガンドの LOX-1 への結合、及び LOX-1 を介する該リガンドの細  
胞内への取込みを阻害する種々のヒトモノクローナル抗体得た。さらに、該ヒト  
モノクローナル抗体が、種々の疾患の予防及び治療に有効であることを見出した。



WO 01/64862 A1

- 1 -

## 明細書

## 酸化 LDL 受容体に対するヒトモノクローナル抗体及びその医薬用途

技術分野

本発明は、ヒト酸化 LDL 受容体 (oxidized-LDL receptor ; 以下「LOX-1」と呼ぶこともある。) に結合するヒトモノクローナル抗体若しくはその一部、該ヒトモノクローナル抗体を産生する細胞、該ヒトモノクローナル抗体または該酸化 LDL 受容体とそのリガンドの相互作用を阻害する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

背景技術

あらゆる組織及び血中に存在する種々形態のコレステロール（遊離型、長鎖脂肪酸型、及びエステル型）は、主に肝臓での生合成に由来する。肝臓で生合成された遊離型コレステロールは、超低密度リポ蛋白（VLDL）に取り込まれ、血中でリポ蛋白リパーゼ（LPL）及び肝性トリグリセリドリパーゼ（HTGL）の作用により、中間密度リポ蛋白（IDL）を経た後、低密度リポ蛋白（LDL ; Low-Density Lipoprotein）へと代謝される。この LDL は、LDL 受容体を介して末梢細胞へと取り込まれることにより、生体の細胞膜の構成において重要な役割を果たしている。

しかしながら、この LDL が、血管内皮細胞などの細胞による作用、種々の化学的・物理的な要因、あるいは熱などの種々の要因により酸化変性を受けると、酸化 LDL (Oxidized LDL) と呼ばれる変性 LDL が血中に生ずることとなる。血流中には十分量の抗酸化物質があるため、もともと血流中には酸化 LDL が生じにくくはあるが、例え生じた場合であっても、それらのほとんどは肝臓で代謝される。

一方、血管内皮下及び血管壁では、血管内皮細胞やマクロファージなどの細胞依存性化学変性並びに  $Fe^{3+}$  などの作用による細胞非依存性化学変性により酸

- 2 -

化 LDL が生ずるが、血流中での生成の場合と異なり、血管内皮下及び血管壁で生じた酸化 LDL は、マクロファージの細胞内に蓄積されることとなる。

酸化 LDL のマクロファージ細胞内への蓄積は、そのようにして生成した酸化 LDL が、種々の変性 LDL (酸化 LDL、アセチル LDL、サクシニル LDL、マロンジアルデヒド LDL) に対する受容体であるマクロファージの細胞表面のスカベンジャー受容体を介して細胞内に取り込まれることによるものである (Nature, Vol.343, p.531-535, 1990 ; Nature, Vol.343, p.570-572, 1990 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.87, p.9133-9137, 1990 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.87, p.8810-8814, 1990 ; Curr. Opin. Lipodol., Vol.2, p.295-300, 1991 ; 及び J. Clin. Invest., Vol.90, p.1450-1457, 1992) 。

このマクロファージスカベンジャー受容体は、LDL 受容体と異なり、細胞内のコレステロールの量に依存した受容体のダウンレギュレーションを受けない。従って、血管内皮下や血管壁に潜り込んだマクロファージは、多量の変性 LDL を取込むことにより細胞内に多量のコレステロールを蓄積し、泡沫細胞化することとなる (「分子動脈硬化学」、第 4 章「炎症細胞 1. スカベンジャー受容体」、第 249-258 頁、1995 年、メディカルレビュー社発行) 。

一方、上述の血管内皮下や血管壁に潜り込んだマクロファージは、血流中、血管内皮下あるいは血管壁などの種々部位で生じた酸化 LDL の生成シグナルに応答して、血流中から移入してきたマクロファージに由来する。即ち、酸化 LDL が、血流中のマクロファージや単球に対して走化性を示し、血管内皮細胞上に単球やマクロファージを集結させる性質、集結した単球やマクロファージの血管内皮下への潜り込み並びに血管壁へ引き込みを誘導する性質、引き込まれた単球のマクロファージへ分化を誘導する性質を誘導、さらに分化を完了したマクロファージの遊走を抑制する性質を有することによるものである。

この単球やマクロファージの血管内皮細胞への集結には、最近同定された血管内皮細胞上に発現している酸化 LDL 受容体 (Oxidized-LDL Receptor、Ox-LDL Re

ceptor または LOX-1 と称される。Nature, Vol.386, p.73-77, 1997、及び脂質生化学研究, Vol.39, p.83-84, 1997 ; Genomics, Vol.54, No.2, p.191-199, 1998; Biochem. J., Vol.339, Part 1, p.177-184, 1999; Biochem. J., Vol.330, Part 3, p.1417-1422, 1998) が深く関与していることが明らかにされつつある。

これまでの研究から、血流中の酸化 LDL が、酸化 LDL 受容体を介して血管内皮細胞に取り込まれると、細胞内での一酸化窒素 (NO) の産生が阻害され、この結果、血管内皮細胞の表面に細胞接着分子の発現が誘導されることが実験的に証明されている。このことから、細胞接着分子が発現する結果、マクロファージや単球が、血管内皮細胞上にトラップされ、トラップされたマクロファージや単球が、血管内皮下及び血管壁に潜り込むものと考えられている。そうして、血管内皮下及び血管壁に潜り込んだマクロファージは、上述したようにマクロファージスカベンジャー受容体を介した酸化 LDL の取込みにより泡沫細胞化するものと考えられている。

この血管壁でのマクロファージの泡沫細胞化は、動脈硬化症の主な原因であることから、動脈硬化症の発症の引金は、上述した単球やマクロファージの血管内皮細胞への集結であると考えられている。

この単球やマクロファージの血管内皮細胞への集結に深く関与する酸化 LDL 受容体 (LOX-1) の生物学的機能及び種々疾患との関連性については目下精力的に研究が進められているところであるが、最近になってさらなる知見が報告されている。

(1) 血管動脈硬化巣において LOX-1 の顕著な発現が見られる (Circulation, Vol.99, No.24, p.3110-3117, 1999)。

(2) 高血圧モデルラットにおいて LOX-1 の発現の上昇が見られる (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.237, No.3, p.496-498, 1997)。

(3) シアストレス (shear stress) により LOX-1 の発現が上昇する (Circ. Res., Vol.83, No.3, p.328-333, 1998)。

- 4 -

(4) LOX-1 は、血管内皮細胞のみならずマクロファージにも発現し、その発現は、TNF  $\alpha$  の刺激により上昇する (FEBS Lett., Vol.440, No.1-2, p.29-32, 1998)。

(5) LOX-1 の発現は、アンギオテンシン II により増強される (Circ. Res., Vol.84, No.9, p.1043-1049, 1999; Circulation, Vol.100, No.9, p.899-902, 1999)。

(6) 酸化 LDL のみならず、生体内の老廃物である apoptotic 細胞 (アポトーシスにより細胞死に向かっている細胞)、老化赤血球、及び活性化血小板なども酸化 LDL 受容体 (LOX-1) を介して細胞内に取り込まれる (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.95, p.9535-9540, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.97, No.1, p.360-364, 2000)。

一方、ヒト酸化 LDL 受容体 (LOX-1) に対する抗体については、非ヒト哺乳動物由来の抗体が報告されているに過ぎず、ヒト由来のモノクローナル抗体の作製、並びに該ヒトモノクローナル抗体を用いた種々疾患の治療の試みについては、未だ全く報告されていない。

#### 発明の開示

酸化 LDL 受容体 (LOX-1) と種々の生体内リガンド (酸化 LDL などの変性 LDL、apoptotic 細胞、老化赤血球、活性化血小板など) の相互作用 (該リガンドの LOX-1 への結合、及び該リガンドの LOX-1 を介した細胞内への取込) は、種々の疾患症状、例えば、動脈硬化症、血小板減少症、腎疾患、種々の炎症 (例えば、心筋虚血再灌流傷害、経皮的冠動脈血栓溶解術 (PTCR) の術後、または経皮的冠血管形成術 (PTCA) の術後における炎症反応など)、PTCA や PTCR の術後の血管再狭窄、血管における血栓の形成などの発症に深く関与する可能性が示唆される。

従って、酸化 LDL 受容体に結合する物質または酸化 LDL 受容体を介する該酸化 LDL 受容体のリガンドの細胞内への取込を阻害する物質 (例えば、合成低分子化

学物質や抗体またはその一部など）を用いて酸化 LDL 受容体と該リガンドとの相互作用を抑制することにより、それらの病態を治療または予防できるものと考えられる。

即ち、本発明は、上述のような種々の疾患の治療に極めて有用なヒト酸化 LDL 受容体 (LOX-1) に対するヒトモノクローナル抗体、並びに該ヒトモノクローナル抗体や該酸化 LDL 受容体とそのリガンドとの相互作用を阻害する物質（例えば、酸化 LDL 受容体に対する種々のモノクローナル抗体や合成低分子化学物質など）を用いる上述の種々疾患を治療するための医薬組成物及びその治療・予防方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上述の目的を達成するために、ヒト酸化 LDL 受容体 (LOX-1) に対するヒトモノクローナル抗体に関して鋭意研究した結果、遺伝子組換え技術を用いてヒトの抗体を産生するように作製したトランスジェニックマウスを可溶性酸化 LDL 受容体などで免疫することによって、ヒト酸化 LDL 受容体に結合する種々のヒトモノクローナル抗体、特にヒト酸化 LDL 受容体に結合し、酸化 LDL 受容体の生体内リガンド（酸化 LDL など）の細胞内への取込を阻害する種々のヒトモノクローナル抗体を作製することに世界に先駆けて初めて成功した。

さらに、本発明のヒト酸化 LDL 受容体 (LOX-1) に結合するヒトモノクローナル抗体が、ヒト酸化 LDL 受容体を介する種々の生体内リガンド（酸化 LDL など）の細胞内への取込を有意に阻害するのみならず、種々疾患（例えば、動脈硬化症、血小板減少症、腎疾患、種々の炎症（例えば、心筋虚血再灌流傷害、経皮的冠動脈血栓溶解術 (PTCR) の術後、または経皮的冠血管形成術 (PTCA) の術後における炎症反応など）、PTCA や PTCR の術後の血管再狭窄など）、血管における血栓の形成の治療、抑制及び／または予防効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトに由来する抗体であることから、マウス由来の抗体等の非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな

問題点（副作用）であったヒトに対する抗原性、即ち HAMA (Human anti-mouse antigenicity) に起因する宿主の重篤な免疫拒絶反応を全く惹起しないことから、抗体の医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

従って、本発明のヒト酸化 LDL 受容体 (LOX-1) に対するヒトモノクローナル抗体及び該ヒトモノクローナル抗体からなる医薬組成物は、HAMA に起因する宿主の免疫拒絶反応を惹起することなく、上述のような種々疾患の発症及び／または進行を抑制、阻止し、該疾患を治療または予防するための医薬品として有用である。

また、該モノクローナル抗体と同様に、ヒト酸化 LDL 受容体とそのリガンドの相互作用（該リガンドの該酸化 LDL 受容体との結合、または該リガンドの該酸化 LDL 受容体を介する細胞内への取込）を阻害する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物も、前記のような種々の疾患症状の治療または予防に極めて有用である。

即ち、本発明の下記(1)乃至(27)に記載されるとおりの発明である。

(1) ヒト酸化 LDL 受容体に結合するヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(2) 該ヒトモノクローナル抗体が、酸化 LDL のヒト酸化 LDL 受容体への結合または酸化 LDL のヒト酸化 LDL 受容体を介した細胞内への取込を阻害する活性を有することを特徴とする前記(1)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(3) 該ヒトモノクローナル抗体のイムノグロブリンクラスが、IgG1 または IgG4 のいずれかであることを特徴とする前記(1)または前記(2)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(4) 該ヒトモノクローナル抗体とヒト酸化 LDL 受容体との結合速度定数 ( $k_a$ ) が、 $1.0 \times 10^4$  (1/M.Sec) 以上の数値であることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

- 7 -

(5) 該ヒトモノクローナル抗体とヒト酸化 LDL 受容体との解離速度定数 ( $k_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-2}$  (1/Sec) 以下の数値であることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(6) 該ヒトモノクローナル抗体とヒト酸化 LDL 受容体との解離定数 ( $K_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-6}$  (M) 以下の数値であることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(7) 該結合速度定数 ( $k_a$ ) が、 $1.0 \times 10^5$  (1/M.Sec) 以上の数値であることを特徴とする前記(4)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(8) 該解離速度定数 ( $k_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-4}$  (1/Sec) 以下の数値であることを特徴とする前記(5)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(9) 該解離定数 ( $K_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-7}$  (M) 以下の数値であることを特徴とする前記(6)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(10) 該解離定数 ( $K_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-8}$  (M) 以下の数値であることを特徴とする前記(9)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(11) 該ヒトモノクローナル抗体が、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(1)乃至前記(10)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(12) 該ヒトモノクローナル抗体が、ヒト酸化 LDL 受容体を発現する細胞、該細胞の可溶性膜画分またはヒト酸化 LDL 受容体の全部若しくは一部を、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られるモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(11)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(13) 該トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、トランスジェニックマウスであることを特徴とする前記(11)または前記(12)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(14) 前記(1)乃至前記(13)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を産生する細胞。

(15) 該細胞が、該ヒトモノクローナル抗体を産生する能力を哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする前記(14)に記載の細胞。

(16) 該細胞が、該ヒトモノクローナル抗体の重鎖をコードする DNA 若しくはその軽鎖をコードする DNA のいずれか一方の DNA、または両方の DNA が細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする前記(14)に記載の細胞。

(17) 前記(1)乃至前記(13)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

(18) 該医薬組成物が、ヒト酸化 LDL 受容体の生体内リガンドの該酸化 LDL 受容体への結合、または該リガンドの該酸化 LDL 受容体を発現する細胞による取込を阻害するために用いられることを特徴とする前記(17)に記載の医薬組成物。

(19) 該医薬組成物が、動脈硬化症の治療に用いられることを特徴とする前記(17)に記載の医薬組成物。

(20) 該医薬組成物が、該酸化 LDL 受容体への血小板若しくは活性化血小板の結合、または該酸化 LDL 受容体を発現する細胞による血小板若しくは活性化血小板の取込に起因する疾患を治療するために用いられることを特徴とする前記(18)に記載の医薬組成物。

(21) 該疾患が、血小板減少を伴う疾患であることを特徴とする前記(20)に記載の医薬組成物。

(22) 該疾患が、腎臓疾患であることを特徴とする前記(20)に記載の医薬組成物。

(23) 該医薬組成物が、白血球の組織への浸潤を阻害するために用いられることを特徴とする前記(17)に記載の医薬組成物。

(24) 該白血球の組織への浸潤が、動脈硬化症、心筋虚血再灌流傷害、経皮的冠動脈血栓溶解術（PTCR）の術後、または経皮的冠血管形成術（PTCA）の術後における炎症反応で見られるものであることを特徴とする前記(23)に記載の医薬組成物。

(25) 該医薬組成物が、炎症の治療に用いられることを特徴とする前記(17)に記載の医薬組成物。

(26) 該炎症が、動脈硬化症、心筋虚血再灌流傷害、経皮的冠動脈血栓溶解術（PTCR）の術後、または経皮的冠血管形成術（PTCA）の術後における炎症であることを特徴とする前記(25)に記載の医薬組成物。

(27) 該医薬組成物が、経皮的冠動脈血栓溶解術（PTCR）または経皮的冠血管形成術（PTCA）の術後血管再狭窄の治療に用いられることを特徴とする前記(17)に記載の医薬組成物。

(28) ヒト酸化 LDL 受容体の生体内リガンドの該酸化 LDL 受容体への結合、または該リガンドの該酸化 LDL 受容体を発現する細胞による取込を阻害する活性を有する物質を含んでなる血栓形成の抑制または予防のための医薬組成物。

(29) 該物質が、ヒト酸化 LDL 受容体に結合するモノクローナル抗体またはその一部であることを特徴とする前記(28)に記載の医薬組成物。

(30) 該モノクローナル抗体またはその一部が、前記(1)乃至前記(13)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部であることを特徴とする前記(29)に記載の医薬組成物。

以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ブタ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ウサギ、ラット、ハムスターまたはマウスであり、特に好ましくは、ヒト、ウサギ、ラット、ハムスターまたはマウスである。

- 10 -

本発明で用いられる「ヒト以外の哺乳動物」及び「非ヒト哺乳動物」なる用語は各々同義であり、前述に定義した哺乳動物におけるヒト以外のあらゆる哺乳動物を意味する。

本発明において用いられる「アミノ酸」とは、自然界に存在するあらゆるアミノ酸を意味し、好ましくは、アミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの三文字表記法または一文字表記法に従って各々下記のように表されるアミノ酸を意味する。

グリシン (Gly/G)、アラニン (Ala/A)、バリン (Val/V)、ロイシン (Leu/L)、イソロイシン (Ile/I)、セリン (Ser/S)、スレオニン (Thr/T)、アスパラギン酸 (Asp/D)、グルタミン酸 (Glu/E)、アスパラギン (Asn/N)、グルタミン (Glu/Q)、リジン (Lys/K)、アルギニン (Arg/R)、システイン (Cys/C)、メチオニン (Met/M)、フェニルアラニン (PHe/F)、チロシン (Tyr/Y)、トリプトファン (Trp/W)、ヒスチジン (His/H)、プロリン (Pro/P)。

本発明でいう「ヒト酸化 LDL 受容体」(「ヒト LOX-1」と称する場合もある。)とは、既報及び配列表等に記載される構造及び機能を有するヒトの酸化 LDL 受容体 (human oxidized-LDL receptor; ox-LDL receptor) を意味する (配列番号 2 ; Nature, Vol.386, p.73-77, 1997 ; Genomics, Vol.54, No.2, p.191-199, 1998; Biochem. J., Vol.339, Part 1, p.177-184, 1999 ; GenBank Accession No.NP 002534)。

また、本発明で言う「ヒト酸化 LDL 受容体」(「ヒト LOX-1」と称する場合もある。)には、上述の既報に記載される天然型のタンパク一次構造 (アミノ酸配列) のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する天然型ヒト酸化 LDL 受容体の変異体も包含する。

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する天然型ヒト酸化 LDL 受容体の変異体」とは下記変異蛋白を意味する。

- 1 1 -

即ち、天然型のヒト酸化 LDL 受容体と実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは 1 乃至 10 個のアミノ酸、特に好ましくは 1 乃至 5 個のアミノ酸が置換、欠失及び／または修飾されているアミノ酸配列を有する変異蛋白、並びに該天然のヒト酸化 LDL 受容体のアミノ酸配列中に、複数個のアミノ酸、好ましくは 1 乃至 10 個のアミノ酸、特に好ましくは 1 乃至 5 個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有する変異蛋白。

さらに、そのような置換、欠失、修飾及び付加の複数を有する変異体であってもよい。

本発明におけるヒト酸化 LDL 受容体は、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

また、本発明における「ヒト酸化 LDL 受容体」（「ヒト LOX-1」とも呼ぶ。）には、該ヒト酸化 LDL 受容体の「一部」も包含される。ここで「一部」とは、前記に定義したヒト酸化 LDL 受容体のアミノ酸配列中の任意の部分配列を含むポリペプチドを意味する。

好ましくは、前記に定義したヒト酸化 LDL 受容体の細胞外領域若しくはその任意の一部を意味する。

ヒト酸化 LDL 受容体の「一部」（好ましくはヒト酸化 LDL 受容体の細胞外領域若しくはその任意の一部）は、後述する当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法に従って、遺伝子組換え技術または化学的合成法により製造することもできるし、また細胞培養方法により単離したヒト酸化 LDL 受容体をタンパク分解酵素等を用いて適切に切断することにより製造することができる。

本発明を構成する「物質」、具体的には「ヒト酸化 LDL 受容体の生体内リガンドの該酸化 LDL 受容体への結合、または該リガンドの該酸化 LDL 受容体を発現す

- 1 2 -

る細胞による取込を阻害する活性を有する物質」には、自然界に存在する天然の物質あるいは人工的に調製される任意の物質を意味する。

該物質は、「蛋白性物質」と「非蛋白性物質」に大別することができる。

ここで、「酸化 LDL 受容体の生体内リガンド」とは、該酸化 LDL 受容体の結合する任意の生体内リガンドを意味し、例えば、酸化 LDL、変性 LDL（アセチル化された LDL やスクシニル化された LDL など）、アポトーシスに向かっている細胞（apoptotic cell）、老化赤血球、あるいは活性化血小板などを挙げることができる。

該「蛋白性物質」としては、ポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または該モノクローナル抗体の一部が挙げられる。

該物質が抗体である場合には、好ましくはモノクローナル抗体である。該物質がモノクローナル抗体である場合には、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、組換えキメラモノクローナル抗体、組換えヒト型モノクローナル抗体、及び後述の「ヒトモノクローナル抗体」が包含される。

該物質が、ポリペプチドである場合には、後述するポリペプチド、該ポリペプチドの断片（オリゴペプチド）、融合ポリペプチド、及びそれらいずれかの化学修飾体が包含される。オリゴペプチドとしては、5乃至30個のアミノ酸、好ましくは5乃至20個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。該化学修飾は、生体に投与された場合の血中半減期の増大あるいは経口投与時における消化管での分解に対する耐性若しくは吸収性の増大の目的等の種々の目的に応じて設計することができる。

該「非蛋白性物質」としては、DNA、RNA 及び化学的に合成された化合物が挙げられる。

ここで、「DNA」とは、前述の酸化 LDL 受容体（LOX-1）をコードする DNA（cDNA 及びゲノミック DNA を含む）の塩基配列を基に設計されるアンチセンス DNA 医薬として有用な「該 DNA の部分塩基配列を含む DNA あるいはそれらを化学修飾

- 13 -

した化学修飾 DNA」を意味する。即ち、該アンチセンス DNA は、LOX-1 をコードする DNA または RNA にハイブリダイズすることにより、該 LOX-1 をコードする DNA の mRNA への転写あるいは該 mRNA の蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した 5 乃至 100 塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した 5 乃至 70 塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した 5 乃至 50 塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した 5 乃至 30 塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、該 DNA をアンチセンス医薬として用いる場合には、該 DNA が患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該 DNA の塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3' 及び／または 5' 末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1 以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホチオエート結合、ホスホジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは 2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは 2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

ここで、「RNA」とは、前述の酸化 LDL 受容体（LOX-1）をコードする RNA の塩基配列を基に設計されるアンチセンス RNA 医薬として有用な「該 RNA の部分塩基配列を含む RNA あるいはそれらを化学修飾した化学修飾 RNA」を意味する。該アンチセンス RNA は、該 LOX-1 をコードする DNA または RNA にハイブリダイズする

- 14 -

ことにより、該 LOX-1 をコードする DNA の mRNA への転写あるいは該 mRNA の蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した 5 乃至 100 塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した 5 乃至 70 塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した 5 乃至 50 塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した 5 乃至 30 塩基の部分塩基配列が挙げられる。

該アンチセンス RNA は、該 RNA が患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該 RNA の塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、前述のアンチセンス DNA に適用されるような化学修飾を挙げることができる。

「化学的に合成された化合物」とは、上述の DNA、RNA 及び蛋白性物質を除く任意の化合物であって、分子量約 100 乃至約 1000 以下の化合物、好ましくは分子量約 100 乃至約 800 の化合物であり、より好ましくは分子量約 100 乃至約 600 の化合物を挙げることができる。

本発明の「ヒトモノクローナル抗体」とは、前記に定義したヒト酸化 LDL 受容体に結合するヒトモノクローナル抗体である。

さらに詳細には、イムノグロブリンを構成する重鎖（H鎖）の可変領域（Variable region）及びH鎖の定常領域（Constant Region）並びに軽鎖（L鎖）の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するヒトイムノグロブリンである。L鎖としては、ヒトκ鎖またはヒトλ鎖が挙げられる。

本発明のヒト酸化 LDL 受容体に結合するヒトモノクローナル抗体は、前記のとおりの本発明の(1)乃至(13)のいずれかに記載される特徴を有するモノクローナル抗体である。

さらに具体的には、後述の実施例並びに図面に記載されるような様々な特性及び産業上の有用性を有する各種のモノクローナル抗体である。

本発明のヒトモノクローナル抗体における好ましい態様としては、前記本発明の(2)乃至(13)のいずれかに記載のヒト酸化 LDL 受容体に結合するヒトモノクローナル抗体である。

本発明の「ヒトモノクローナル抗体」は、下記のいずれかの免疫原（抗原）を以下に述べるヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより作製することができる。

(イ) 前記に定義したヒト酸化 LDL 受容体を細胞表面に発現する天然の細胞または人工的に樹立した細胞株；

(ロ) 前記に定義したヒト酸化 LDL 受容体を細胞表面に発現するように遺伝子組換え技術を用いて作製された遺伝子組換え細胞；

(ハ) 前記(イ)または(ロ)の細胞を可溶化して得た細胞可溶化物 (cell lysate)、または該 cell lysate から精製したヒト酸化 LDL 受容体のポリペプチド断片；

(ニ) 前記に定義したヒト酸化 LDL 受容体の一部（特に好ましくは、その細胞外領域若しくはその任意のペプチド）を可溶性ポリペプチドとして発現するように遺伝子組換え技術を用いて作製された遺伝子組換え細胞；

(ホ) 前記(ニ)の遺伝子組換え細胞を培養して得た培養上清若しくは該培養上清から精製されたヒト酸化 LDL 受容体の細胞外領域ポリペプチド（可溶性ヒト酸化 LDL 受容体）；または

(ヘ) 化学的に合成されたヒト酸化 LDL 受容体の一部（（特に好ましくは、その細胞外領域若しくはその任意のペプチド））。

さらには、本発明のヒトモノクローナル抗体は、遺伝子組換え技術を用いて、そのような本発明のヒトモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードする cDNA により宿主細胞を形質転換して得られる遺伝子組換え細胞であって、遺伝

子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する本発明の「遺伝子組換え細胞」を培養することにより培養上清中から得ることもできる。

また、本発明ヒトモノクローナル抗体は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (IgA1、IgA2)、IgD または IgE のいずれのアイソタイプを有するヒトモノクローナル抗体であってもよい。好ましくは、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) であり、好ましくは IgG1、IgG2 または IgG4 であり、特に好ましくは IgG1 または IgG4 である。

本発明のヒトモノクローナル抗体は、後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのようなヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物に前述の (イ) 乃至 (へ) のいずれかの免疫原 (抗原) を免疫し、モノクローナル抗体の既存の一般的な製造方法に従って製造することができる。

即ち、例えば、該抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、該ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞 (ミエローマ細胞) から融合細胞 (ハイブリドーマ) を調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

さらに具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述の (イ) 乃至 (ハ) のいずれかの免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、該ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物 (特に好ましくは後述の「ヒト抗体産生トランスジェニックマウス」) の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に 1 乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約 1 乃至 14 日毎に 1 乃至 4 回免疫を行って、最終免疫より約 1 乃至 5 日後に免疫感作され

- 17 -

た該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

ヒトモノクローナル抗体を分泌する融合細胞（ハイブリドーマ）の調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（Nature, Vol.256, p.495-497, 1975）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作されたヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ P3/X63-Ag8.653 (ATCC No. CRL-1580)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP2/0-Ag14 (Sp2/0, Sp2)、PAI、F0 あるいは BW5147、ラット由来ミエローマ 210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマ U-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11 あるいは CEM-T15 を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生する細胞（例えば、ハイブリドーマ）のスクリーニングは、該細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えば RIA (radio immunoassay) や ELISA (enzyme-linked immuno-solvent assay) 等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

- 18 -

また、該ハイブリドーマあるいは後述する遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する本発明の「遺伝子組換え細胞」からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、トランスジェニック動物作製技術を用いて当該遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、当該トランスジェニック動物のミルク中から当該ヒトモノクローナル抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

該モノクローナル抗体産生細胞をインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham' F12 培地、MCDB153 培地あるいは低カルシウム MEM 培地等の低カルシウム培地及び MCDB104 培地、MEM 培地、D-MEM 培地、RPM I1640 培地、ASF104 培地あるいは R D 培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含有することができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAE または DE52 等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテイン A カラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

本発明のヒトモノクローナル抗体には、該抗体を構成する重鎖及び／または軽鎖の各々のアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び／または軽鎖からなるヒトモノクローナル抗体も包含される。

ここで、「数個のアミノ酸」とは、複数個のアミノ酸を意味し、具体的には 1 乃至 10 個のアミノ酸であり、好ましくは 1 乃至 5 個のアミノ酸である。

本発明のヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列中に、前記のようなアミノ酸の部分的改変（欠失、置換、挿入、付加）は、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法（Site specific mutagenesis）を用いて常法により導入することができる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.81, p. 5662-5666, 1984）。

本発明における「ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物」、特に好ましい態様であるヒト抗体産生トランスジェニックマウスは、既報に従って作製することができる（Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平 4-504365 号公報; 特表平 7-509137 号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年; 国際出願公開WO 94/25585 号公報; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; 及び特表平 6-500233 号公報など）。

該ヒト抗体産生トランスジェニックマウスは、具体的には、例えば下記の工程からなる手法を用いることにより作製できる。他のヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物も同様にして製造することができる。

（1）マウス内在性イムノグロブリン重鎖遺伝子座の少なくとも一部を相同組換えにより薬剤耐性マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子など）で置換することにより該マウス内在性イムノグロブリン重鎖遺伝子が機能的に不活性化されたノックアウトマウスを作製する工程。

（2）マウス内在性イムノグロブリン軽鎖遺伝子座の少なくとも一部を相同組換えにより薬剤耐性マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子など）で置換することにより該マウス内在性イムノグロブリン軽鎖遺伝子（特に $\kappa$ 鎖遺伝子）が機能的に不活性化されたノックアウトマウスを作製する工程。

- 20 -

(3) 酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) ベクター等に代表されるような巨大遺伝子を運搬可能なベクターを用いて、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の所望の領域がマウス染色体中に組み込まれたトランスジェニックマウスを作製する工程。

(4) YAC 等に代表されるような巨大遺伝子を運搬可能なベクターを用いて、ヒト免疫グロブリン軽鎖 (特に  $\kappa$  鎖) 遺伝子座の所望の領域がマウス染色体中に組み込まれたトランスジェニックマウスを作製する工程。

(5) 前記 (1) 乃至 (4) のノックアウトマウス及びトランスジェニックマウスを任意の順序で交配することにより、マウス内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座及びマウス内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座がともに機能的に不活性化され、且つヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の所望の領域及ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の所望の領域がともにマウス染色体上に組み込まれたトランスジェニックマウスを作製する工程。

前記ノックアウトマウスは、マウス内在性イムノグロブリン遺伝子座の適当な領域を外来性マーカー遺伝子 (ネオマイシン耐性遺伝子など) で相同組換えにより置換することにより該遺伝子座が再構成 (リアレンジメント) できないように不活性化することにより作製できる。該相同組換えを用いた不活性化には、例えば、ポジティブ・ネガティブ・セレクション (Positive Negative Selection; P NS) と呼称される方法を用いることができる (日経サイエンス, 5月号, p.52-62, 1994)。

イムノグロブリン重鎖遺伝子座の機能的な不活性化には、例えば、J 領域または C 領域 (例えば C $\mu$  領域) の一部に障害を導入することにより達成できる。またイムノグロブリン軽鎖 (例えば  $\kappa$  鎖) に機能的な不活性化は、例えば、J 領域若しくは C 領域の一部、または J 領域及び C 領域にまたがる領域を含む領域に障害を導入することにより達成可能である。

- 2 1 -

トランスジェニックマウスは、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法（例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照）に従って作製することが可能である。具体的には、例えば、正常マウス胚盤胞 (blastocyst) に由来する HPRT 陰性（ヒポキサンチン・グアニン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を欠いている）ES 細胞 (embryonic stem cell) を、該ヒトイムノグロブリン重鎖遺伝子座または軽鎖遺伝子座をコードする遺伝子またはその一部並びに HPRT 遺伝子が挿入された YAC ベクターを含む酵母とスフェロプラスト融合法により融合する。該外来性遺伝子がマウス内在性遺伝子上にインテグレートされた ES 細胞を HAT セレクション法により選別する。次いで、選別した ES 細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.12, pp.7380-7384, 1980 ; 米国特許第 4,873,191 号公報)。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、キメラトランスジェニックマウスが生まれる。該キメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ (heterogeneous) トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモ (homogeneous) トランスジェニックマウスが得られる。

本発明における「モノクローナル抗体の一部」とは、前述の本発明のヒトモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には  $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$  (variable fragment of antibody)、 $sFv$ 、 $dsFv$  (disulphide stabilised Fv) あるいは  $dAb$  (single domain antibody) 等が挙げられる (エキスパート・オピニオン・オン・テラピューティック・パテンツ (Exp. Opin. Ther. Patents), 第6巻, 第5号, 第441～456頁, 1996年)。

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 $Fab'$ 」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することによ

- 22 -

り製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて $V_L$ （L鎖可変領域）と $C_L$ （L鎖定常領域）からなるL鎖、及び $V_H$ （H鎖可変領域）と $C_H\gamma 1$ （H鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fab'という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

本発明における「結合速度定数（ $k_a$ ）」とは、抗原抗体反応速度論に基づき算出される該モノクローナル抗体の標的抗原への結合の強さ（程度）を示す値を意味する。「解離速度定数（ $k_d$ ）」とは、抗原抗体反応速度論に基づき算出される該モノクローナル抗体の標的抗原からの解離の強さ（程度）を示す値を意味する。「解離定数（ $K_d$ ）」とは、該「解離速度定数（ $k_d$ ）」値を該「結合速度定数（ $k_a$ ）」値で除して求められる値である。これらの定数は、該モノクローナル抗体の抗原に対する親和性及び抗原の中和活性を表す指標として用いられる。

当該定数は、種々の方法に従って解析することができるが、市販の測定キットである BiacoreX（アマシャムファルマシア社製）または類似のキットを用い、

当該キットに添付の取扱い説明書及び実験操作方法に従って容易に解析することができる。当該キットを用いて求められる $k_a$ 値、 $k_d$ 値及び $K_d$ 値は各々、1/M.Sec、1/Sec 及びM（モル）なる単位を以て表される。試験されたモノクローナル抗体は、 $k_a$ 値が大きいほど強い抗原結合活性を有していることを示し、 $K_d$ 値が小さいほど強い中和活性を有していることを示す。

- 23 -

本発明のヒトモノクローナル抗体には、下記（１）乃至（３）に示されるような $k_a$ 値、 $k_d$ 値または $K_d$ 値を有するヒトモノクローナル抗体が含まれる。

（１）ヒト酸化 LDL 受容体との結合速度定数（ $k_a$ ）が、 $1.0 \times 10^4$ (1/M.Sec)以上の数値、好ましくは $1.0 \times 10^5$ (1/M.Sec)以上の数値であるヒト酸化 LDL 受容体または一部に反応性を有するヒトモノクローナル抗体。

（２）ヒト酸化 LDL 受容体との解離速度定数（ $k_d$ ）が、 $1.0 \times 10^{-2}$ (1/Sec)以下、好ましくは $1.0 \times 10^{-4}$ (1/Sec)以下の数値であるヒト酸化 LDL 受容体またはその一部に反応性を有するヒトモノクローナル抗体。

（３）ヒト酸化 LDL 受容体との解離定数（ $K_d$ ）が、 $1.0 \times 10^{-2}$ (1/Sec)以下、好ましくは $1.0 \times 10^{-7}$ (M)以下、より好ましくは $1.0 \times 10^{-8}$ (M)以下の数値であるヒト酸化 LDL 受容体またはその一部に反応性を有するヒトモノクローナル抗体。

なお、上述の $k_a$ 、 $k_d$ 及び $K_d$ の各々の値は、測定時の諸条件に依存して多少の変動は誤差範囲として起こり得ることが予測されるが、指数についてはほとんど変動しないのが一般的である。

本発明の「モノクローナル抗体を産生する細胞」あるいは遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する本発明の「遺伝子組換え細胞」とは、前述した本発明のヒトモノクローナル抗体を産生する任意の細胞を意味する。

具体的には、例えば、下記（１）乃至（３）のいずれかに記載される細胞を挙げることができるがこの限りではない。

（１）前記で定義した免疫原（抗原）を前述のヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られ、該被免疫動物から採取され得るヒトモノクローナル抗体産生B細胞。

（２）そのようにして得られたヒトモノクローナル抗体産生B細胞を哺乳動物由来のミエローマ細胞と細胞融合して得られる前述の融合細胞（ハイブリドーマ）。

- 2 4 -

(3) 該ヒトモノクローナル抗体産生B細胞またはヒトモノクローナル抗体産生融合細胞（ハイブリドーマ）から単離される該ヒトモノクローナル抗体をコードする遺伝子（重鎖をコードする遺伝子若しくは軽鎖をコードする遺伝子のいずれか一方、または両方の遺伝子）で、該B細胞及びハイブリドーマ以外の細胞（例えば、CHO（Chinese hamster ovarian）細胞）、BHK（Baby hamster kidney）細胞などを形質転換して得られる遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する遺伝子組換え細胞。

ここで、前記（3）に記載の遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する遺伝子組換え細胞は、即ち、前記（1）のB細胞または（2）のハイブリドーマが産生するヒトモノクローナル抗体の遺伝子組換え体を産生する遺伝子組換え細胞を意味する。

本発明における「医薬組成物」は、有効成分としての本発明の（1）ヒト酸化LDL受容体に結合するヒトモノクローナル抗体若しくはその一部と「薬学的に許容され得る担体」とからなる医薬品として有用な組成物、及び（2）ヒト酸化LDL受容体の生体内リガンドの該酸化LDL受容体への結合、または該リガンドの該酸化LDL受容体を発現する細胞による取込を阻害する活性を有する物質と「薬学的に許容され得る担体」とからなる医薬品として有用な組成物を意味する。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。

そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トローチ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、

常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記タンパクや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき  $10\mu\text{g}$  から  $1000\text{mg}$ （あるいは  $10\mu\text{g}$  から  $500\text{mg}$ ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に  $0.1\mu\text{g}$  抗体/ $\text{ml}$  担体～ $10\text{mg}$  抗体/ $\text{ml}$  担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。

このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において  $1\text{kg}$  体重あたり、 $1\mu\text{g}$ ～ $100\text{mg}$  の割合で、好ましくは  $50\mu\text{g}$ ～ $50\text{mg}$  の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、種々の病態及び疾患の発症に関与する酸化 LDL 受容体の生体内リガンド（酸化 LDL などの種々の変性 LDL、apoptotic 細胞、老化赤血

- 26 -

球、活性化血小板など)の酸化 LDL 受容体への結合、または該リガンドの酸化 LDL 受容体を介した細胞内への取込を阻害するために有用である。

とりわけ、本発明の医薬組成物の一つである前記ヒトモノクローナル抗体からなる医薬組成物は、ヒト由来のモノクローナル抗体からなることから、HAMA に起因する宿主の免疫拒絶反応を惹起することなく以下のような種々の疾患の治療または予防に適用することができる。

本発明の医薬組成物は、上述のような酸化 LDL 受容体とその生体内リガンドとの相互作用(結合または取り込み)に起因する種々の疾患(例えば、動脈硬化症、血小板減少症、腎疾患、種々の炎症(例えば、心筋虚血再灌流傷害、経皮的冠動脈血栓溶解術(PTCR)の術後、または経皮的冠血管形成術(PTCA)の術後における炎症反応など)、PTCA や PTCR の術後の血管再狭窄など)、動脈等の血管での血栓の形成などの種々の疾患の発症及び/または進行を抑制、阻止し、該疾患または疾患症状を治療または予防するための医薬品として有用である。

ここで、本発明における「炎症」とは、内的要因または細菌感染、外傷、物理的刺激(例えば、熱、寒冷、放射線、電気など)あるいは化学物質などの外的要因に限定されない種々要因による生体組織の傷害あるいは機能不全において、白血球が血管内皮細胞上でのローリング、接着を経て、血流中からの血管外組織への浸潤を伴う基本的な病理上の局所反応を意味する。

通常炎症は、その発現速度及び進行速度により急性炎症と慢性炎症に大別される。一般に急性炎症とは、炎症反応が比較的急速に発現し進行が速く、その終了が明確な炎症である。一方、慢性炎症とは、炎症反応が比較的ゆっくりあるいは徐々に発現し、あるいはその発現の存在すた不明確な程度に発現し、数週間乃至数年間にわたり持続され、その終了も不明確な炎症である。本発明の炎症には、そのような急性炎症及び慢性炎症のいずれをが包含される。

本発明における炎症としては、脳、眼、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、胃、腸、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻炎膜あるいは関節などの組織における炎症が含

- 27 -

まれる。具体的には、例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、膵炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎（糸球体腎炎など）、関節炎（関節リウマチなど）、虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCA や PTCR の術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症を挙げることができる。

また、本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、本発明の医薬組成物（ヒト抗体や合成低分子化合物など）を既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

例えば、動脈硬化症及び血管再狭窄への効果の検討の場合には、ラット大動脈にバルーンカテーテルを挿入し PTCA を施し疑似的に作成した再狭窄モデルを使用することができる。

また、炎症や組織傷害に対する治療効果の検討の場合には、ラットに LPS を投与することにより誘導した炎症や組織傷害（例えば、肺傷害）の疾患モデルを使用することができる。

さらには、グリセロール誘発ラット急性腎障害モデル、ラット GBM 腎炎モデル、アンギオテンシン II 誘発ラット動脈硬化モデル（高血圧誘発性動脈硬化症モデル）、ApoE ノックアウトマウス（高脂血症動脈硬化モデル）などに本発明の抗体を投与することにより、本発明のヒト抗体の種々腎疾患や動脈硬化症に対する治療効果を測定することができる。

本発明において用いられるヒト酸化 LDL 受容体をコードする DNA は、常法に従って、該ヒト酸化 LDL 受容体をコードする mRNA から cDNA をクローン化する方法、ゲノム DNA を単離してスプライシング処理する方法、該 cDNA 配列若しくは mRNA 配列を鋳型として PCR により調製する方法、または化学合成する方法等により取得することができる。

本発明のヒト酸化 LDL 受容体をコードする DNA は、そのようにして調製した該ヒト酸化 LDL 受容体をコードする各々の DNA を適切な制限酵素による切断（消

- 28 -

化) し、得られた DNA 断片を、必要に応じてリンカーDNA あるいはタグ (Tag) と共に、適切な DNA ポリメラーゼ等を用いて連結することにより調製することができる。

該ヒト酸化 LDL 受容体 (以下、目的蛋白という) をコードする cDNA を mRNA からクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。

まず、目的蛋白を発現・産生する組織あるいは細胞から目的蛋白をコードする mRNA を調製する。mRNA の調製は、例えばグアニジンチオシアネート法 (Biochemistry, Vol.18, p.5294, 1979)、熱フェノール法もしくは AGPC 法等の公知の方法を用いて調製した全 RNA をオリゴ (dT) セルロースやポリ U-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

次いで得られた mRNA を鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法、例えばオカヤマらの方法 (Mol. Cell. Biol., Vol.2, p.161, 1982 及び同誌 Vol.3, p.280, 1983) やホフマン (Hoffman) らの方法 (Gene, Vol.25, p.263, 1983) 等により cDNA 鎖を合成し、cDNA の二本鎖 cDNA への変換を行う。この cDNA をプラスミドベクター、ファージベクターまたはコスミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入 (トランスフェクト) することにより cDNA ライブラリーを作製する。

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとして pUC19、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11 等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で目的蛋白をコードする遺伝子を発現させるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

プラスミドに cDNA を組み込む方法としては、例えばマニアティス (Maniatis) らの方法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, p.1.53, 1989) に記載の方法などが挙げられる。

また、ファージベクターに cDNA を組み込む方法としては、ヒュン (Hyunh) らの方法 (DNA Cloning, a practical approach, Vol.1, p.49, 1985) などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット (例えば、宝酒造社製等) を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞 (例えば、E.coli : HB101, DH5 $\alpha$ , Y1090, DH10B または MC1061/P3 等) 等の適当な宿主に導入する。

プラスミドを宿主に導入する方法としては、(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, p.1.74, 1989) に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージ DNA をインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット (例えば、ストラタジーン社製、アマシャム社製等) を用いることによって簡便に行うことができる。

上記の方法によって作製された cDNA ライブラリーから、目的蛋白をコードする cDNA を単離する方法は、一般的な cDNA スクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。

例えば、別個に目的蛋白のアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを  $^{32}\text{P}$  でラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法 (クランシュタイン (Crunstein) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.72, p.3961, 1975) またはブランクハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, p.2.108, 1989) により、目的の cDNA を含有するクローンをスクリーニングする方法、PCR プライマーを作製し目的蛋白の特定領域を PCR 法により増幅し、該領域をコードする DNA 断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。

- 30 -

また、cDNA を発現しうるベクター（例えば、 $\lambda$ gt11 等のファージベクター）を用いて作製した cDNA ライブラリーを用いる場合には、目的蛋白に反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR 法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

この様にして得られた DNA の塩基配列はマキシム・ギルバート法（マキシム（Maxam）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol74, p.560, 1977）あるいはファージ M13 を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法（サンガー（Sanger）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.74, p.5463-5467, 1977）によって決定することができる。目的蛋白をコードする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

また、前述のような目的蛋白を発現する細胞に由来するゲノム DNA から目的蛋白をコードする DNA を単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。

該細胞を好ましくは SDS またはプロテナーゼ K 等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復して DNA の脱蛋白質を行う。RNA を好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られる DNA を適当な制限酵素により部分消化し、得られる DNA 断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識された DNA プローブを用いる方法等により検出し、該クローンから目的蛋白をコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

目的蛋白をコードする DNA の PCR による調製は、該目的蛋白の既知の mRNA または cDNA 等を鋳型として常法により調製することができる（「遺伝子増幅 PCR 法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992 年など）。

- 3 1 -

また、化学的合成による目的蛋白をコードする DNA の製造は、目的蛋白の塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

本発明のヒト酸化 LDL 受容体またはその一部（好ましくは細胞外領域）は、上述に例示した方法を用いて調製したヒト酸化 LDL 受容体をコードする DNA（cDNA あるいはイントロンを含むゲノミック DNA）を、各々適切な制限酵素で切断することにより、該ヒト酸化 LDL 受容体コードする DNA 断片を得、それらの断片を、必要に応じてリンカーDNA あるいはタグ（Tag）と共に、適切な DNA ポリメラーゼ等を用いて連結させて得た DNA を用いて、慣用される遺伝子組換え技術を用いて、常法により組換え蛋白として調製することができる。

具体的には下記の例示されるとおりである。即ち、上述のようにして調製した DNA を、下記に詳述するようなベクターに挿入して発現ベクターを作成し、該発現ベクターで後述するような宿主細胞を形質転換して形質転換体を得る。該形質転換体を培養することにより、培養上清中に該目的蛋白を産生させる。培養上清中の該目的蛋白は、カラムクロマトグラフィー等を用いて容易に精製することができる。

組換えヒト酸化 LDL 受容体（またはその細胞外領域）を製造するために用いられる発現ベクター、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される（Cloning Vectors: A Laboratory Manual, エルスビュー社、ニューヨーク、1985 年）。

当該発現ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（プラスミド DNA およびバクテリアファージ DNA）にヒト酸化 LDL 受容体（またはその細胞外領域）をコードする DNA を常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えば pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19 など、酵母由来プラスミドとして例えば pSH19、pSH15 など、枯草菌由来プラスミドとして例

- 3 2 -

例えば pUB110、pTP5、pC194 などが例示される。また、ファージとしては、入ファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス (pVL1393、インビトロゲン社製) が例示される。

本発明のヒト酸化 LDL 受容体またはその可溶性細胞外領域をコードする DNA を発現させヒト酸化 LDL 受容体を宿主細胞表面に発現させ、またはヒト酸化 LDL 受容体の可溶性細胞外領域を生産させる目的においては、プラスミドベクターが有用である。プラスミドベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で該ヒト酸化 LDL 受容体またはその可溶性細胞外領域をコードする遺伝子を発現し、これらのポリペプチドを生産する機能を有するものであれば特に制限されない。例えば、pMAL C2、pcDNA3.1(-)、pEF-BOS (Nucleic Acid Research, Vol.18, p.5322, 1990 など) あるいは pME18S (実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992 年等) 等を挙げることができる。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明のタンパクをコードする DNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のヒト酸化 LDL 型受容体 (またはその細胞外領域) コードする DNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードする DNA、エンハンサー配列、本発明のヒト酸化 LDL 受容体をコードする遺伝子の 5' 側および 3' 側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子 (マーカー) を含んでいてもよい。

細菌中で本発明のヒト酸化 LDL 受容体 (またはその細胞外領域) を発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよび

- 3 3 -

Shine-Dalgarno(SD)配列（例えば、AAGG など）を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適には Trp プロモーター、lac プロモーター、recA プロモーター、 $\lambda$ PL プロモーター、lpp プロモーター、tac プロモーターなどを含むものが例示される。

酵母中で本発明のヒト酸化 LDL 受容体（またはその細胞外領域）を発現させるためのプロモーターとしては、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01 プロモーター、SP02 プロモーター、penP プロモーターなどが挙げられる。

また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、例えば SV40 由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG, TAA, TGA）が例示される。

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全 DNA 配列を複製することができる能力をもつ DNA を言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製された DNA フラグメント）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E.coli ではプラスミド pBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322 を適当な制限酵素で処理して得られる DNA フラグメント）が、酵母では酵母 2  $\mu$  プラスミド、もしくは酵母染色体 DNA が、また哺乳動物細胞ではプラスミド pRSVneo ATCC 37198、プラスミド pSV2dhfr ATCC 37145、プラスミド pdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミド pSV2neo ATCC 37149、プラスミド pSV2bsr 等があげられる。

- 3 4 -

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれ SV40 に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードする DNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化や T4 DNA リガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当な DNA フラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素部位など）を用いることができる。

本発明の形質転換細胞は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞など）が例示される。

好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌 (DH5 $\alpha$ 、DH10B、TB1、HB101、XL-2Blue 等)、マウス由来細胞 (COP、L、C127、Sp2/0、NS-1 また

- 3 5 -

は NIH3T3 等)、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞 (BHK および CHO 等)、サル由来細胞 (COS1、COS3、COS7、CV1 及び Velo 等) およびヒト由来細胞 (HeLa、2 倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞および Namalwa 等) などが例示される。

発現ベクターの宿主細胞への導入 (形質転換 (形質移入)) は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌 (*E.coli*、*Bacillus subtilis* 等) の場合は、例えば Cohen らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.69, p.2110, 1972)、プロトプラスト法 (Mol. Gen. Genet., Vol.168, p.111, 1979) やコンピテント法 (J. Mol. Biol., Vol.56, p.209, 1971) によって、*Saccharomyces cerevisiae* の場合は、例えばハイネン (Hinnen) らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.75, p.1927, 1978) やリチウム法 (J. Bacteriol., Vol.153, p.163, 1983) によって、動物細胞の場合は、例えばグラハム (Graham) の方法 (Virology, Vol.52, p.456, 1973)、昆虫細胞の場合は、例えばサマーズ (Summers) らの方法 (Mol. Cell Biol., Vol.3, p.2156-2165, 1983) によってそれぞれ形質転換することができる。

本発明のヒト酸化 LDL 受容体の細胞外領域 (可溶性ヒト酸化 LDL 受容体) は、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換細胞 (以下、形質移入体を包含する意味で使用する。) を栄養培地で培養することによって製造することができる。

栄養培地は、宿主細胞 (形質転換体) の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素 (例えば、無機塩 (例えば塩化カルシウム、リ

- 3 6 -

ン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類、抗生物質(例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等)など)を含んでいてもよい。

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地の pH および培養時間は、本発明のタンパクが大量に生産されるように適宜選択される。

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pH が 5 ~ 8 である培地である。

宿主が E.coli の場合、好ましい培地として LB 培地、M 9 培地 (ミラー (Miller) ら、Exp. Mol. Genet、Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972)、YT 培地等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常 14~43°C、約 3 ~ 24 時間行うことができる。

宿主が Bacillus 属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常 30~40°C、約 16~96 時間行うことができる。

宿主が酵母である場合、培地として、例えば Burkholder 最小培 (ボスチアン (Bostian)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, p.4505, 1980) が挙げられ、pH は 5 ~ 8 であることが望ましい。培養は通常約 20~35°C で約 14~144 時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約 5 ~ 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 (Science, Vol.122, p.501, 1952)、DMEM 培地 (Virology, Vol.8, p.396, 1959)、RPMI1640 培地 (J. Am. Med. Assoc., Vol.199, p.519, 1967)、199 培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol.73, p.1, 1950)、HamF12 培地等を用いることができる。培地の pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましく、培養は通

- 37 -

常約 30～40℃で約 15～72 時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含む Grace's 培地 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p.8404, 1985) 等が挙げられ、その pH は約 5～8 であるのが好ましい。培養は通常約 20～40℃で 15～100 時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

本発明のヒト酸化 LDL 受容体の細胞該領域 (可溶性ヒト酸化 LDL 受容体) は、上述のような形質転換細胞 (特に動物細胞または大腸菌) を培養することにより、培養上清中に分泌させることにより製造することができる。即ち、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液 (上清) を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って目的蛋白を精製、単離する。

単離、精製方法としては、例えばアフィニティーカラムクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

一方、目的蛋白が培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で目的蛋白を含有する膜画分を得る。該膜画分を、トライトン-X100 等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いることにより、単離、精製することができる。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、ヒト LOX-Fc キメラ蛋白を用いた ELISA により測定した抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体のヒト LOX-1 に対する反応性（結合活性）を示す図。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の種類を示す。

図 2 は、ヒト LOX-1 発現組換え CHO 細胞を用いた細胞 ELISA により測定した抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体のヒト LOX-1 に対する反応性（結合活性）を示す図。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の種類を示す。

図 3 は、ヒト LOX-1 発現組換え CHO 細胞を用いた酸化 LDL の細胞内への取込試験における、抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の酸化 LDL 取込阻害活性を示す図。

縦軸は細胞内に取り込まれた酸化 LDL の量の指標となる蛍光強度を示し、横軸は加えた抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の濃度を示す。

図 4 は、抗ヒト酸化 LDL 受容体（LOX-1）に対する各種のヒトモノクローナル抗体の特性を示す図。

丸印は、下記を意味する。

#### <ELISA>

○： 有意な抗原結合活性（反応性）が検出された。

△： 弱いながら有意な抗原結合活性（反応性）が検出された。

×： 有意な抗原結合活性（反応性）が検出されなかった。

#### <酸化 LDL 取込阻害試験>

○： 有意な酸化 LDL の取込阻害活性を示した。

△： 弱いながら有意な酸化 LDL の取込阻害活性を示した。

- 3 9 -

×： 有意な酸化 LDL の取込阻害活性を示さなかった。

図 5 は、細胞 ELISA により測定した抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体のヒト由来天然細胞株 HeLa S-3 上のヒト LOX-1 に対する反応性（結合活性）を示す図。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の種類を示す。

図 6 は、ヒト由来天然細胞株 HeLa S-3 を用いた酸化 LDL の細胞内への取込試験における、抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の酸化 LDL 取込阻害活性を示す図。

縦軸は酸化 LDL を取込んだ細胞の割合（％）示し、横軸は加えた抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の濃度を示す。

図 7 は、ヒト由来天然細胞株 HeLa S-3 を用いた酸化 LDL の細胞内への取込試験における、抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の酸化 LDL 取込阻害活性を示す図。

縦軸は細胞内に取り込まれた酸化 LDL の量の指標となる蛍光強度を示し、横軸は加えた抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の濃度を示す。

図 8 は、ウシ LOX-1 発現組換え CHO 細胞を用いた酸化 LDL の細胞内への取込試験における、抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の酸化 LDL 取込阻害活性を示す図。

縦軸は細胞内に取り込まれた酸化 LDL の量の指標となる蛍光強度を示し、横軸は加えた抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の濃度を示す。

図 9 は、血小板減少症に対する抗 LOX-1 抗体の治療学的効果を示す図。

図 10 は、白血球の組織への浸潤に対する抗 LOX-1 抗体の阻害効果を示す図。

図 11 は、白血球の組織への浸潤に対する抗 LOX-1 抗体の阻害効果を示す図。

図 12 は、白血球の組織への浸潤に伴う炎症反応の進行のパラメーターである蛋白漏出に対する抗 LOX-1 抗体の阻害効果を示す図。

- 4 0 -

図 1 3 は、PTCA を施術した後の血管再狭窄に対する抗 LOX-1 抗体の阻害効果を示す図。

図 1 4 は、動脈における血栓の形成に対する抗 LOX-1 抗体の阻害効果を示す図。

黒色の領域は、血管の閉塞（血栓の形成）が見られた時間を模式的に示し、また白色の領域は血流が見られた時間を模式的に示す。

図 1 5 は、動脈における血栓の形成に対する抗 LOX-1 抗体の阻害効果を示す図。

縦軸は、血流（血流音）が見られた時間を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

なお、以下の実施例においては、「酸化 LDL 受容体」を「LOX-1」と称する場合もある。

#### 実施例 1 各種組換え LOX-1 の調製

##### <1-1> 可溶性ウシ LOX-1 (ウシ LOX-Fc) の作製

ウシ酸化 LDL 受容体 LOX-1 (bLOX-1) をコードする cDNA (配列番号 3) を、既報 (Nature, Vol.386, p.73-77, 1997 及び特開平 9-98787 号公報) に記載の方法と同様にして調製した。

得られた cDNA を、2つのプライマー (5'-GGGGATCCTGATCTCATAAAGAAACAG-3' (配列番号 5)、及び 5'-GCGGATCCTGTGCTCTCAATAGATTCGC-3' (配列番号 6) を用いて PCR により増幅し、BamHI 切断部位が両端に付加されたウシ LOX-1 の細胞外領域をコードする cDNA (配列番号 3 の塩基番号 215 乃至 844) を含む cDNA 断片を調製した。

ヒト IgG1 のヒンジ領域、C $\gamma$ 12、及び C $\gamma$ 13 の各々コードするエクソンを含むゲノミック DNA を含んでいるプラスミド pCd5lneg1 (DNA and Cell Bio 1., Vol.9, p.347-353, 1990 参照。マサチューセッツ・ゼネラル・ホスピタル

- 4 1 -

のシード博士 (B. Seed) から入手。配列番号 7 に記載の塩基配列を有する) を、BamHI で消化して線状化した。

前述のようにして得られたウシ LOX-1 の細胞外領域をコードする cDNA を、T4 DNA リガーゼを用いて、この線状化プラスミドの BamHI 切断部位 (配列番号 7 の塩基番号 169 番目) に連結し、プラスミド pBLOX-Fc を構築した。

10%FBS (fetal bovine serum) 含有 HamF12 培地中でサブコンフルエントに単層培養した CHO-K1 細胞を、リポフェクタミン (Lipofectamine、GIBCO 製) を用いて、pBLOX-Fc (1  $\mu$ g) 並びに発現プラスミドベクター pSVbsr (10 ng、フナコシ製; bsr (Blasticidin S-resistance) 遺伝子及び SV40 ウイルス由来のプロモーターを含む) により共形質転換した。

48 時間の培養後、培地を、blasticidin-S (10  $\mu$ g/ml、フナコシ製) 含有 HamF12 培地に替えたさらに培養することにより、pBLOX-Fc 及び pSVbsr で共形質転換された形質転換細胞を選択、取得した。

得られた形質転換細胞は、10%FCS (fetal calf serum) 及び blasticidin-S (10  $\mu$ g/ml、フナコシ製) を含有する HamF12 培地中で維持した。

bLOX-1-Fc を精製するため、blasticidin-S (10  $\mu$ g/ml、フナコシ製) を含有する HamF12 培地中でコンフルエントに培養した形質転換体 CHO-K1 細胞の培地を CHO-SFM-II (GIBCO/BRL 製) に替え、3 日間培養した。この操作を数回繰返した後、培養上清 800ml を得た。培養上清中の bLOX-Fc は、Affi-Gel Protein A MA PS-II kit (Bio-rad 製) を用いて次のように精製した。

培養上清を、予め結合緩衝液 (binding buffer) で平衡化したプロテイン A アガロースゲルカラムに加えた。次いで、カラムを結合緩衝液 (15 bed volume) で洗浄した後、溶出緩衝液 (elution buffer、5 bed volume) で溶出させた。溶出液を回収し、リン酸緩衝液で 2 回以上外液交換することにより透析し、精製 bLOX-Fc を得た。得られた精製 bLOX-Fc を、濃縮するため Centriprep (アミコン

- 4 2 -

製)を用いて限外濾過した。BCA protein assay kit (PIERCE 製)を用いて、86  $\mu\text{g/ml}$  の精製 bLOX-Fc が得られたことを確認した。

また、上記精製 bLOX-Fc の取得は、下記ウェスタンブロッティングによっても確認した。

精製 bLOX-Fc を 12.5%SDS アガロースゲル (第一化学) にアプライし、電気泳動した。泳動終了後、Immobilon メンブラン (ミリポア製) にブロッティングした。メンブランを Block Ace (雪印製) で一晩ブロッキングした。一次抗体としてのビオチン標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体及び A B C キット (Vector 製) を用いて反応を行い、コニカイムノステインキットを用いて発色を行った。

さらに、上記と同様にして、サル腎臓由来細胞株 COS7 を宿主細胞とする組換え細胞を用いて bLOX-Fc を調製した。

#### <1-2> CHO 細胞でのウシ LOX-1 の作製

ウシ LOX-1 (アミノ酸配列: 配列番号 4、GenBank Accession No.BAA19005; 塩基配列: 配列番号 3、GenBank Accession No.D89049) を発現する組換え CHO 細胞 (Chinese hamster ovarian cell) を、沢村の報文 (Nature, Vol.386, p.73-77, 1997) と同様にして調製した。

#### <1-3> 抗ウシ LOX-1 マウスモノクローナル抗体の作製

後述する抗ヒト酸化 LDL 受容体ヒトモノクローナル抗体の作製で用いた抗原 (ヒト LOX-1 を発現する組換え CHO 細胞の細胞膜画分) の調製と同様にして、前記で調製したウシ LOX-1 を発現する CHO 細胞から細胞膜画分を抗原として調製した。

得られた細胞膜画分を、後述する抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の作製と同様の方法に従って正常マウスに免疫し、ウシ LOX-1 に対するマウスモノクローナル抗体 (ヒト LOX-1 にも交叉反応性を有する) を調製した。

#### <1-4> 可溶性ヒト LOX-1 (ヒト LOX-Fc; hLOX-Fc) の作製

- 4 3 -

ヒト LOX-1 の全長をコードする cDNA (配列番号 1) を PCR 法を用いて常法により調製した。

具体的には、市販のヒト胎盤由来 mRNA (Clontech 製 ; カタログ番号 #6501) から逆転写酵素を用いて作製した 1 本鎖 DNA を鋳型とし、ヒト LOX-1 の全長 cDNA (Nature, Vol.386, p.73-77, 1997 及び特開平 9-98787 号公報) を基に設計したプライマーを用いて常法に従って PCR により合成した。

プライマーとしては、5'-ATGACTTTTGATGACCTAAAGATCCAG-3' (配列番号 8) 及び 5'-CACTGTGCTCTTAGGTTTGCCTTC-3' (配列番号 9) を使用した。

PCR は、1 サイクル (94°C で 2 分)、30 サイクル (94°C で 30 秒、65°C で 30 秒、及び 72°C で 90 秒)、及び 1 サイクル (72°C で 7 分) を行った。

DNA ポリメラーゼには、市販の KOD DNA ポリメラーゼ (TOYOBO 製) を用いた。

得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動 (Qiaquick PCR Purification Kit ; Quiagen 製) に付した。得られた cDNA 断片をゲルから切り出し、常法に従ってプラスミドに挿入した。この cDNA 断片を後述のハイブリダイゼーションのプロープとして用いた。

前記ヒト由来 mRNA を基に、市販の cDNA 作製キット (SuperScript Lamda System ; Gibco BRL 製) を用い cDNA を作製した。得られた cDNA を市販のラムダファーム ( $\lambda$ ZipLox ; Gibco BRL 製) に連結した後、市販の GigaPack Gold (Amersham 製) を用いてインビトロパッケージングした。得られたファージ粒子を用いて、Y1090 を宿主細胞として、組換えファージを含有するプラークからなる cDNA ライブラリーを作製した。

cDNA ライブラリー ( $4 \times 10^4$  プラーク / プレート) を寒天プレートに蒔き、ナイロンメンブレン (Hybond N+, Amersham 製) に写しレプリカを作製した。上記で得たヒト LOX-1 の cDNA 断片を [ $^{32}$ P]dCTP で標識 (Quickprime ; Pharmacia 製) しプラークハイブリダイゼーション用プロープ溶液とした。このプロープ溶液を用いて、該レプリカの 1 次及び 2 次スクリーニングをし、複数の陽性クローンを

- 4 4 -

得た。各クローンをシングルプラークで単離した後、GIBCO-BRL 社のマニュアルに従ってインビボエクサイジョン (in vivo Excision) に供し、プラスミド DNA として回収した (プラスミド : M13K07; Gibco BRL 製)。

次いで、市販のキット (Dye Primer Cycle Sequencing FS Core Kit; PerkinElmer Applied Biosystems 製) 及び機械 (ABI Prism 373A; PerkinElmer Applied Biosystems 製) を用いて、各クローンに挿入されているヒト LOX-1 の cDNA の塩基配列を決定し、ヒト LOX-1 の全長をコードする cDNA が得られたことを確認した。

得られたヒト cDNA を用いて、実施例<1-1>と同様にしてヒト LOX-1 の可溶性領域 (アミノ酸番号 : 65-273) とヒト IgG-Fc とからなるキメラ蛋白 (hLOX-Fc) をサル腎臓由来細胞株 COS7 を宿主とする組換え細胞より調製した。

#### <1-5> CHO 細胞での組換えヒト LOX-1 の作製

実施例<1-2>で得たヒト LOX-1 の全長をコードする cDNA を、ベクター pEF-NEO に挿入した後、該組換え発現ベクターを、常法に従ってエレクトロポレーション (960  $\mu$ F、320 ボルト) によりチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) に導入した。細胞を、Geneticin (0.8mg/ml; Gibco BRL 製) 及び 10%FCS 含有 RPMI1640 培地中で培養することにより薬剤耐性形質転換細胞を選択した。さらに、前記で調製したヒト LOX-1 に交叉反応性を有するウシ LOX-1 に対するモノクローナル抗体を用いて後述の実施例と同様の ELISA 及び後述の実施例と同様の DiI 標識酸化 LDL の取込アッセイにより有意な値を示す細胞を選択し、限界希釈法によってクローニングを行った。得られたヒト LOX-1 発現 CHO 細胞から ISOGEN (日本ジーン製) を用いて全 RNA を抽出後、常法に従って RT-PCR を行い、制限酵素マッピングによりヒト LOX-1 の全長 cDNA の導入を確認した。

#### <1-6> CHO 細胞での各種非ヒト哺乳動物の組換え LOX-1 の作製

- 4 5 -

沢村らの報文 (Nature, Vol.386, p.73-77, 1997) を参照しながら、前述の実施例と同様にしてブタ、ウサギ及びラット各々の LOX-1 を発現する組換え CHO 細胞を作製した。

#### ウサギ LOX-1

アミノ酸配列：配列番号 1 0、GenBank Accession No.BAA81912

塩基配列：配列番号 1 1、GenBank Accession No.AB016237

#### ブタ LOX-1

アミノ酸配列：配列番号 1 2、GenBank Accession No.BAA88894

塩基配列：配列番号 1 3、GenBank Accession No.AB018668

#### ラット LOX-1

アミノ酸配列：配列番号 1 4、GenBank Accession No.BAA25785

塩基配列：配列番号 1 5、GenBank Accession No.AB005900

#### <1-7> フラグ (FLAG) 付加した可溶性ヒト LOX-1 の調製

ヒト LOX-1 の全長をコードする cDNA 配列を基に設計した一対のプライマーを用いて、該全長 cDNA を鋳型として PCR により、ヒト LOX-1 の細胞該領域 (アミノ酸番号：65-273) をコードする cDNA を調製した。得られた cDNA を市販の発現ベクター pFLAGCMV-1 (Kodak 製) に挿入した。

ここで、FLAG とは、該ベクターに挿入される目的遺伝子によりコードされる蛋白の N 末端に付加される付加ペプチド配列を意味する。即ち、当該プラスミドに目的遺伝子を挿入して取得される組換え蛋白発現ベクターで形質転換した形質転換細胞を培養することにより得られる目的の組換え蛋白は、N 末端に FLAG が付加されることとなる。従って、本試験で調製される組換え蛋白は、N 末端に FLAG ペプチドが付加された可溶性ヒト LOX-1 組換え蛋白である。

エレクトロポレーション法 (960  $\mu$ F、300 ボルト) により、常法に従って、サル腎臓由来細胞株 COS7 に上記で得たヒト LOX-1 の細胞外領域をコードする cDNA

- 46 -

が挿入された pFLAGCMV を導入した。細胞を、FCS をコーティングした培養皿を用いて ASF104 培地（味の素製）中で無血清培養し、培養上清を回収した。

回収した培養上清は、抗体 FLAG 抗体アフィニティーゲル（Kodak 製）を充填したカラムに加えた。カラムを TBS で洗浄した後、0.1M のグリシン-HCl (pH3.0 ; 0.9ml/フラクション) で溶出した。溶出後、直ちに、1M の Tris-HCl (pH9.0) で中和した。回収した溶出分画を SDS ゲル電気泳動に付し、FLAG 付加ヒト LOX-1 可溶性蛋白 (FLAG-hLOX-1) が溶出されている分画を同定した。

FLAG-hLOX-1 を含む分画をリン酸緩衝液で透析 (0.22 $\mu$ m フィルトレーション) した後、得られた精製 FLAG-hLOX-1 の吸光度 (O.D.280) を測定し蛋白量を算出した。

#### <1-8> フラグ (FLAG) 付加した可溶性ウシ LOX-1 の調製

前記と同様にして、ウシ酸化 LDL 受容体の細胞外領域 (アミノ酸番号 : 61-270) の N 末に FLAG ペプチドが付加された FLAG-bLOX-1 を調製した。

#### 実施例 2 抗原の調製

前記で調製したヒト LOX-1 発現 CHO 細胞を 5mM の EDTA-PBS で処理 (室温、5 分) した後、プロテアーゼ阻害剤含有緩衝液 (25mM の HEPES (pH7.4)、10mM の MgCl<sub>2</sub>、0.25M の Sucrose、及びプロテアーゼ阻害剤 (10U/ml の Aprotinine、2 $\mu$ g/ml の Pepstatin、50 $\mu$ g/ml の Leupeptin、及び 0.35mg/ml の PMSF) ) 中に懸濁し、ポッター式ホモジナイザーで破碎し、低速遠心 (1,500rpm、10 分、4°C) した。次いで、上清を回収し、超遠心 (100,000g、1 時間、4°C) し、沈殿した膜面分を回収しリン酸緩衝液中に懸濁しマイナス 20°C で保存した。この懸濁液を後述する本発明のヒト抗体の作製における抗原 (免疫原) として用いた。

#### 実施例 3 抗ヒト酸化 LDL 受容体ヒトモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、実験医学 (別冊) 細胞工学ハンドブック (黒木登志夫ら編集、羊土社発行、第 66~第 74 頁、1992 年) 及び単

- 47 -

クローン抗体実験操作入門（安東民衛ら著作、講談社発行、1991 年）等に記載されるような一般的方法に従って調製した。

免疫原としてのヒト酸化 LDL 受容体は、前記で調製したヒト LOX-1 発現 CHO 細胞から調製した膜画分を用いた。

被免疫動物としては、前述の方法を用いて製造したヒト抗体産生トランスジェニックマウスを用いた（Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994 ; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997 ; 特表平 4-504365 号公報 ; 特表平 7-509137 号公報 ; 日経サイエンス、6 月号、第 40～第 50 頁、1995 年等）。

細胞培養操作は、マルチウェルマイクロプレートを用いて行った。

#### <3-1> 抗ヒト酸化 LDL 受容体ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

前記で調製したヒト LOX-1 発現 CHO 細胞の膜画分と完全フロインドアジュバント（Freund's Complete Adjuvant、ICN/CAPPEL 社製）との等量混合物を、前記のヒト抗体産生トランスジェニックマウスのフッドパッド内に注射することにより初回（0 日）免疫した。初回免疫から 1 週間毎に該ヒト LOX-1 発現 CHO 細胞の膜画分のみを該トランスジェニックマウスのフッドパッド内に注射により 5 回以上追加免疫し、さらに以下に述べるリンパ節細胞の取得の前々日にも同細胞膜画分のみを同様にして注射し最終免疫した。

最終免疫の 2 日後に、各々のマウスから膝下、鼠けい部、及び腸骨からリンパ節を採取し、マウスミエローマ細胞 P3/X63-AG8.653（ATCC No.: CRL-1580）とを 5 : 1 で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール 1500（ベーリンガーマンハイム製）を用いて細胞融合させることにより細胞融合を行った。次いで、HAT（Sigma 製）及び 10%FCS 含有 Excel301 培地中で薬剤選択し多数のハイブリドーマを得た。

#### <3-2> モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの ELISA によるスクリーニング

- 48 -

以下に述べる ELISA により、前記で調製したハイブリドーマから抗ヒト酸化 LDL 受容体ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。

#### <3-2-1> ELISA (その 1)

前記で調製した可溶性組換えヒト LOX-Fc キメラ蛋白発現 COS7 細胞を培養し、回収した培養上清をプロテイン A カラム (Pharmacia 製) で精製して可溶性組換えヒト LOX-Fc キメラ蛋白 (hLOX-Fc) を取得した。

該 hLOX-Fc ( $4\mu\text{g/ml} \times 50\mu\text{l/well}$ 、PBS 中) を、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Coaster 製) の各ウェルに加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートし、hLOX-Fc をマイクロプレートに吸着させた。

次いで、上清を捨て、各ウェルに、ブロッキング試薬 ( $200\mu\text{l}$ ; 市販の Block-Ace (商品名)) を加え室温で 2 時間インキュベートし、hLOX-Fc が結合していない部位をブロックした。各ウェルを、0.1% の Tween20 を含有するリン酸緩衝液で 2 回洗浄した。このようにして、各ウェルを hLOX-Fc でコーティングしたマイクロプレートを作製した。

各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 ( $50\mu\text{l}$ ) を加え、1 時間反応させた後、各ウェルを、0.1% の Tween20 を含有するリン酸緩衝液で 3 回洗浄した。

次いで、該ハイブリドーマ上清に含まれるヒトイムノグロブリン (ヒトモノクローナル抗体) の重鎖の検出のために、各ウェルにペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒトイムノグロブリン (Fc) 抗体 ( $1/7000$  希釈を  $50\mu\text{l}$ ; Ameircan Corex 製) を加え、室温下で 30 分インキュベートした。

一方、該ハイブリドーマ上清に含まれるヒトイムノグロブリン (ヒトモノクローナル抗体) の軽鎖の検出のためには、各ウェルにペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒトイムノグロブリン  $\kappa$  鎖抗体 ( $1/3000$  希釈を  $50\mu\text{l}$ ) を加え、室温下で 30 分インキュベートした。

- 4 9 -

マイクロプレートを、0.1%の Tween20 を含有するリン酸緩衝液で 3 回洗浄後、テトラメチルベンジジン (3,3',5,5',-tetramethylbenzidine (TMB)、100 $\mu$ l、BIO-RAD 製) を各ウェルに加え、室温下 30 分間インキュベートした。

次いで、0.5M の  $H_2SO_4$  (25 $\mu$ l) を各ウェルに加え、反応を止めた。波長 450nm での吸光度をバイオラッド、モデル 3550 マイクロプレートリーダー (Model 3550 Microplate Reader、BIO-RAD 製) で測定した。

この結果、抗ヒト酸化 LDL 受容体ヒトモノクローナル抗体を産生する複数ハイブリドーマが選択された。

陰性対照試験は、いずれのハイブリドーマの上清を加えないで上記と同様に操作した。

結果を図 1 に示す。

この結果、いずれのハイブリドーマが産生する抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体も、組換え可溶性ヒト LOX-1 に有意に結合する (親和性を有する) ことが示された。

#### <3-2-2> ELISA (その 2 ; 細胞 ELISA)

前記で作製したヒト酸化 LDL 受容体発現 CHO 細胞 (1 $\times 10^4$ 細胞/ウェル) を、ELISA 用 96 穴マイクロプレートの各ウェルに蒔き、37°C で 2 日間培養した。

次いで、上清を捨て、各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 (50 $\mu$ l/ウェル) を加え、1 時間反応させた後、各ウェルを、FCS を含有しない ASF104 培地 (味の素製) で 2 回洗浄した。

次いで、該ハイブリドーマ上清に含まれるヒトイムノグロブリン (ヒトモノクローナル抗体) の重鎖の検出のために、各ウェルにペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒトイムノグロブリン (Fc) 抗体 (1/7000 希釈を 50 $\mu$ l ; Ameircan Corex 製 ; 0.5%BSA/ASF104 培地中) を加え、室温下で 30 分インキュベートした。

- 50 -

マイクロプレートを、FCS を含まない ASF104 培地で 2 回洗浄後、テトラメチルベンジジン (3,3',5,5',-tetramethylbenzidine (TMB)、100 $\mu$ l、BIO-RAD 製) を各ウェルに加え、室温下 30 分間インキュベートした。

次いで、0.5M の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25 $\mu$ l) を各ウェルに加え、反応を止めた。波長 450nm での吸光度をバイオラッド、モデル 3550 マイクロプレートリーダー (Model 3550 Microplate Reader、BIO-RAD 製) で測定した。

この結果、抗ヒト酸化 LDL 受容体ヒトモノクローナル抗体を産生する複数ハイブリドーマが選択された。

対照試験として、ヒト酸化 LDL 受容体発現 CHO 細胞の代わりに前記で作製したウシ酸化 LDL 受容体発現 CHO 細胞を上記と同様にして各ウェルに蒔いたマイクロプレートを用いて同様にして試験を行った。

陰性対照試験は、いずれの組換え CHO 細胞をも含まないマイクロプレートを用いて上記と同様にして操作した。

また、陰性対照抗体として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH (keyhole limpet hemocyanin、ピアース (PIERCE) 社製) を免疫して前記と同様にして調製した抗 KLH ヒトモノクローナル抗体を用いて、上記と同様にして試験した。

結果を図 2 に示す。

この結果、いずれのハイブリドーマが産生する抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体も、組換え CHO 細胞が発現するヒト LOX-1 に有意に結合する (親和性を有する) ことが示された。また、いくつかの抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体が、ウシ LOX-1 にも交叉反応性を有することが示された。

実施例 4 抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体による酸化 LDL の取込阻害活性

上記でスクリーニングした各ハイブリドーマの培養上清に含まれる抗酸化 LDL 受容体ヒトモノクローナル抗体の酸化 LDL 受容体に対する中和活性を、酸化 LDL

の細胞内への取込の阻害活性の有無を測定することにより下記のようにして分析した。

#### <4-1> DiI 標識ヒト酸化 LDL の調製

健康人の血漿を、臭化カリウム (KBr) を加えて、比重を 1.019 に調整した後、Beckman L-80 超遠心機で遠心し (20 時間、58000rpm)、下層を別のチューブに回収した。回収した液量を測定し、臭化カリウムを加えて比重を 1.063 に調整した。次いで、Beckman L-80 超遠心機で遠心し (20 時間、58000rpm)、上層を別のチューブに回収した。回収した画分を、リン酸緩衝液で透析 (外液を 2 回以上交換) し、精製ヒト LDL を得た。蛋白量を BCA protein assay kit (PIERCE 製) を用いて測定した。蛋白量は、10.3 mg/ml であった。

得られた精製 LDL から酸化 LDL を調製するため、精製 LDL 及び硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4$ ) の濃度が、各々 3 mg/ml 及び 75  $\mu\text{M}$  となるように調整した溶液を、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 20 時間インキュベートした。次いで、EDTA を含有する 0.15M の塩化ナトリウム溶液にて透析し (外液を 2 回以上交換)、ヒト酸化 LDL を得た。蛋白量を BCA protein assay kit (PIERCE 製) を用いて測定した。蛋白量は、2.32 mg/ml であった。

上記のように調製した精製 LDL 及び酸化 LDL の各々を、アガロースゲル (Titan Gel Lipoproteins, ヘレナ研究所製) にのせ、アガロース電気泳動を行った (定電圧: 90 ボルト、25 分間)。ゲルを 55°C の乾燥機中で乾燥させ、Fat red 7B 染色液を加え、脂質の染色を行った。次いで、70%メタノールで脱色させ、再度ゲルを 55°C の乾燥機中で乾燥させた。TBARS (過酸化脂質  $\text{LP}_0$ ) 測定キット ( $\text{LP}_0$  テストワコー (和光製)) を用いて、脂質の酸化度を計測した。得られた脂質の酸化度は 24.74 mol/mg protein であった。このようにして得たヒト酸化 LDL を標準物質として用いた。

- 52 -

得られたヒト酸化 LDL を、市販の標識物質（「DiI」と略称；1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-perchlorate；フナコシ製）を用いて実験操作マニュアルに従って標識し、DiI-ヒト酸化 LDL を得た。

#### <4-2> 酸化 LDL の細胞内取込阻害活性の測定

前記で作製したヒト LOX-1 発現 CHO 細胞（ $5 \times 10^4$  細胞/ウェル）またはウシ LOX-1 発現 CHO 細胞（ $5 \times 10^4$  細胞/ウェル）を 24 穴マイクロプレートに蒔きコンフルエント（confluent）な状態になるまで培養した。培養上清を捨て、各ウェルに、上記で作製したハイブリドーマの培養上清（ $150 \mu\text{l}$ /ウェル）、40%NBCS（New born calf serum； $40 \mu\text{l}$ /ウェル）、及び前記で調製した DiI-ヒト酸化 LDL（ $80 \mu\text{g}/\text{ml} \times 10 \mu\text{l}$ /ウェル）の順に加え、 $37^\circ\text{C}$ で 2 時間培養した。プレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、各ウェルに 1%NP-40（ $200 \mu\text{l}$  PBS/ウェル；Nonizet P-40；ナカライテスク製）を加え、室温で 30 分間培養した。

各ウェルの培養上清（ $180 \mu\text{l}$ /ウェル）を 96 穴マイクロプレートに移した後、Fluoroscanner II（Labsystems 製）を用いて蛍光解析（蛍光波長：590nm；励起波長：544nm）を行った。

なお、対照試験として、いずれのハイブリドーマ上清をも加えない場合、及び DiI-ヒト酸化 LDL を加えない場合の各々について上記と同様にして試験した。

また、陰性対照抗体として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH（keyhole limpet hemocyanin、ピアース（PIERCE）社製）を免疫して前記と同様にして調製した抗 KLH ヒトモノクローナル抗体を用いて、上記と同様にして試験した。

結果を図 3 に示す。

この結果、いずれのハイブリドーマが産生する抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体も、LOX-1 を介する酸化 LDL の細胞内への取込を有意に阻害する活性を有することが示された。

実施例 5 抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプの決定

- 53 -

前記でスクリーニングした各々のハイブリドーマが産生する抗ヒト酸化 LDL 受容体ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを、前述した ELISA（その 1）と同様に決定した。

但し、本 ELISA においてはプレートにコーティングする可溶性ヒト酸化 LDL 受容体として、hLOX-Fc キメラ蛋白の代わりに前記で調製した精製 FALG-hLOX-1 を用いた。

該ヒトモノクローナル抗体の重鎖（H 鎖）が IgG であるか IgM であるかを解析するために、2 次抗体として、市販のペーオキシダーゼで標識した抗ヒト IgG-Fc 抗体または抗ヒト IgM 抗体を用いた。

該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖（L 鎖）が Ig $\kappa$  であるか Ig $\lambda$  であるかを解析するために、2 次抗体として、市販のペーオキシダーゼで標識した抗ヒト Ig $\kappa$  抗体または抗ヒト Ig $\lambda$  抗体を用いた。

いずれのハイブリドーマが産生する抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体も、IgG/ $\kappa$  であることが確認された。

#### 実施例 6 ハイブリドーマのクローニング

上記の複数の ELISA、酸化 LDL 取込阻害活性試験、及びアイソタイピングにより同定したヒト酸化 LDL に対する中和ヒトモノクローナル抗体を産生する各々のハイブリドーマを、上記の試験を複数回繰り返すことによりサブクローニングし、該抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体を産生する複数種類の各々単一のハイブリドーマを取得した。

#### 実施例 7 抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の大量調製

10%の Ultra Low Bovine IgG FBS (GIBCO-BRL 社製) を含有する ASF104 培地 (味の素社製) に馴化した前記の各々のハイブリドーマクローン (各々  $1 \sim 2 \times 10^6$  個/ml) を、インテグラセルライン 1000 (INTEGRA CL1000、インテグラバイオサイエンス社製) に播種し培養を行った。7 乃至 10 日間の培養後、培養細胞数

- 5 4 -

が約  $1 \times 10^8$  個/ml に達した時点で、各々のハイブリドーマの培養上清を回収した。

次いで、各々のハイブリドーマの培養上清を遠心 (3,000rpm、10 分間) して得た遠心上澄を、ハイトラッププロテイン G カラム (HiTrap affinity column Protein G、アマシャムファルマシア社製) に供した。次いで、リン酸緩衝液でカラムを洗浄後、プロテイン G カラムに 100mM のクエン酸と 150mM の NaCl からなる溶液 (pH2.0) を加え抗体を溶出させた。溶出液に 750mM の Tris-HCl からなる溶液 (pH9.0) を加え中和した後、フィルター (ミリポア社製) で濾過し、白沈を除いた。得られた濾液をリン酸緩衝液で透析 (一晚) した後、フィルター (ミリポア社製) で濾過して各々の精製ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体を得た。

#### 実施例 8 抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体のサブクラスの決定

前記で調製した各々の該抗ヒト LOX-1IgG ヒトモノクローナル抗体のサブクラスを、ヒトモノクローナル抗体アイソタイプ決定用キット (アメリカン・コーレックス社製) を用い、該キットに添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い決定した。

いずれの抗 LOX-1 ヒトモノクローナル抗体も IgG2/ $\kappa$  もしくは IgG4/ $\kappa$  であることが確認された (図 4)。

#### 実施例 9 ヒト LOX-1 を発現する天然ヒト由来細胞に対する反応性の試験

前記で調製した各々の抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の天然ヒト由来細胞に対する反応性 (結合活性) を下記のようにして測定した。

##### <9-1> HeLa S-3 でのヒト LOX-1 の発現 (その 1 : 細胞 ELISA)

天然ヒト由来細胞 HeLa S-3 での LOX-1 分子の発現を前述の ELISA (その 2 ; 細胞 ELISA) と同様にして確認した。

HeLa S-3 細胞 ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル ; ATCC CLL-2.2 ; 大日本製薬製) をコーゲン TypeI コーティングした 96 穴マイクロプレートに蒔き 10%FCS 含有 Ham's F12 培地中で 37°C で 2 日間培養した。培養上清を捨て、0.1%BSA 含有 Ham's F

- 5 5 -

12 培地で洗浄した後、各ウェルに組換えヒト TNF  $\alpha$  (10ng/ml  $\times$  200  $\mu$ l/ウェル) を加え 37°C で 6 時間培養した。培養上清を捨て、前記で調製した各種の抗ヒト L OX-1 ヒトモノクローナル抗体 (50  $\mu$ l/ウェル) を加え室温で 1 時間反応させた後、各ウェルを、培地で 2 回洗浄した。

次いで、各ウェルにペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒトイムノグロブリン (Fc) 抗体 (1/7000 希釈を 50  $\mu$ l ; Ameircan Corex 製) を加え、室温下で 30 分インキュベートした。マイクロプレートを培地で 2 回洗浄後、テトラメチルベンジジン (3,3' ,5,5' , -tetramethylbenzidine (TMB)、100  $\mu$ l、BIO-RAD 製) を各ウェルに加え、室温下 30 分間インキュベートした。

次いで、0.5M の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25  $\mu$ l) を各ウェルに加え、反応を止めた。波長 450nm での吸光度をバイオラッド、モデル 3550 マイクロプレートリーダー (Model 3550 Microplate Reader、BIO-RAD 製) で測定した。

対照試験として、HeLa S-3 細胞を 10%FCS を含有しない Ham's F12 培地中で培養したマイクロプレートを用いて同様にして試験を行った。

また、陰性対照試験として、前記で調製した抗 KLH ヒトモノクローナル抗体を用いて、上記と同様にして試験した。

結果を図 5 に示す。

この結果、HeLa S-3 細胞がヒト LOX-1 を有意に発現することが確認された。

<9-2> HeLa S-3 でのヒト LOX-1 の発現 (その 1 : ノーザンブロッティング)

天然ヒト由来細胞 HeLa S-3 での LOX-1 分子の発現を常法に従ってノーザンブロッティング法を用いて確認した。

HeLa S-3 細胞 (1  $\times$  10<sup>4</sup> 細胞/ウェル ; ATCC CLL-2.2 ; 大日本製薬製) をコラーゲン TypeI コーティングした 96 穴マイクロプレートに蒔き 10%FCS 含有 Ham's F12 培地中で 37°C で 2 日間培養した。培養上清を捨て、0.1%BSA 含有 Ham's F12 培地で洗浄した後、各ウェルに組換えヒト TNF  $\alpha$  (10ng/ml  $\times$  200  $\mu$ l/ウェル) を加え 37°C で 6 時間培養した。次いで、常法に従って該細胞から取得した全 RNA

- 56 -

から poly(A)<sup>+</sup>RNA を調製した。該 poly(A)<sup>+</sup>RNA をアガロースゲル電気泳動に供し、常法に従ってナイロン膜上にブロッティングした。

前記で調製した組換えヒト LOX-Fc キメラ蛋白発現プラスミドを [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham 製) で標識したものをハイブリダイゼーションプローブとした。

作製した poly(A)<sup>+</sup>RNA ブロッティング膜に、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 標識 hLOX-1 DNA をハイブリダイズさせた後、膜を洗浄 (1×SSC と 0.1%SDS で室温 20 分、及び 0.1×SSC と 0.1%SDS で 65°C20 分 (3 回) ) し、オートラジオグラフィーに供した。

なお、ハイブリダイゼーションは、下記試薬及び条件を用いて常法に従って行った。

(1) ハイブリダイゼーション溶液 (20×SSC (45ml ; 6 倍希釈 ; ナカライテスク製)、50×Denhardt 溶液 (15ml ; 5 倍希釈 ; 和光純薬製)、10%SDS (7.5ml ; 0.5%)、及び蒸留水 (82.5ml) ; 全量 150ml)

(2) サケ精子 DNA (10mg/ml ; Gibco BRL 製)

(3) ハイブリダイゼーションプローブ溶液 ([ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 標識 hLOX-1 DNA (5 $\mu$ l ; 5ng/ $\mu$ l) 及び蒸留水 (40 $\mu$ l) ; 全量 45 $\mu$ l)

(4) プレハイブリダイゼーション 1 (サケ精子 DNA を含まないハイブリダイゼーション溶液 10ml で 10 分)

(5) プレハイブリダイゼーション 2 (サケ精子 DNA 含有ハイブリダイゼーション溶液 18ml で 3 時間 (65°C))

(6) ハイブリダイゼーション (プローブ 13.6 $\mu$ l、65°C、氷上)

その結果、約 2.5Kb の大きさのバンド (理論値 : 約 2.5Kb) が検出され、HeLa S-3 細胞が LOX-1 を発現する細胞であることが示された。

<9-3> HeLa S-3 細胞の酸化 LDL の取込活性及び抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体による取込阻害活性

- 57 -

前記の試験でヒト LOX-1 の発現が確認された天然ヒト由来細胞 HeLa S-3 の酸化 LDL の取込活性、並びに抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体の該酸化 LDL の細胞内への取込の阻害活性を下記のように測定した。

HeLa S-3 細胞 ( $5 \times 10^4$  細胞/ウェル ; ATCC CLL-2.2 ; 大日本製薬製) をコラーゲン TypeI コーティングした 24 穴マイクロプレートに蒔き 10%FCS 含有 Ham's F12 培地中で 37°C で 2 日間培養した。培養上清を捨て、0.1%BSA 含有 Ham's F12 培地で洗浄した後、各ウェルに組換えヒト TNF  $\alpha$  ( $10\text{ng/ml} \times 200\mu\text{l}$ /ウェル) を加え 37°C で 6 時間培養した。培養上清を捨て、前記で調製した各種の抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体 ( $150\mu\text{l}$ /ウェル)、40%NBCS (New born calf serum ;  $40\mu\text{l}$ /ウェル)、及び前記で調製した DiI-ヒト酸化 LDL ( $80\mu\text{g/ml} \times 10\mu\text{l}$ /ウェル) の順で加え、37°C で 1 時間培養した。プレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、各ウェルに 5mM の EDTA (PBS $100\mu\text{l}$ /ウェル中) を加え、室温で 5 分間培養した。次いで、各ウェルに 10%FCS (PBS $100\mu\text{l}$ /ウェル中) を加え細胞を回収した。

フローサイトメーター (励起波長 : 488nm、測定波長 : 575nm) を用いて、DiI-酸化 LDL を取り込んだ細胞の割合 (%)、及び細胞内に取り込まれた DiI-酸化 LDL の量 (蛍光強度) を測定した。

なお、対照試験として、いずれの抗 LOX-1 ヒトモノクローナル抗体をも加えない場合、及び DiI-ヒト酸化 LDL を加えない場合の各々について上記と同様にして試験した。

また、陰性対照抗体として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH (keyhole limpet hemocyanin、ピアース(PIERCE)社製) を免疫して前記と同様にして調製した抗 KLH ヒトモノクローナル抗体を用いて、上記と同様にして試験した。

結果を図 6 及び図 7 に示す。

- 58 -

この結果、HeLa S-3 細胞が酸化 LDL を取り込むこと、並びにいずれの抗ヒト L<sup>OX</sup>-1 ヒトモノクローナル抗体もが天然細胞による L<sup>OX</sup>-1 を介する酸化 LDL の取込を有意に阻害する活性を有することが示された。

実施例 10 抗ヒト L<sup>OX</sup>-1 ヒトモノクローナル抗体の抗原に対する親和性及び中和活性の測定

前記で作製した種々の抗ヒト酸化 LDL 受容体 (L<sup>OX</sup>-1) に対するヒトモノクローナル抗体のヒト L<sup>OX</sup>-1 との結合速度定数 ( $k_a$ )、解離速度定数 ( $k_d$ ) 及び解離定数 ( $K_d$ ) を、市販の測定キット Biacore X (Amersham-Pharmacia 製) を用いて測定した。

なお、下記に述べる抗原のセンサーチップへの固定化以外の操作は、当該キットに添付の取扱い説明書及び実験操作法に従って行った。

センサーチップに固定化するヒト L<sup>OX</sup>-1 は、前記で調製したヒト L<sup>OX</sup>-Fc キメラ蛋白を用いた。

キットに付随のフローセル 1 (Flow Cell 1) に、0.01M の HBS 緩衝液 (0.15M の NaCl、3mM の EDTA 及び 0.005% の界面活性剤 P20 を含有。pH7.0) を 5  $\mu$ l/分で流し、100  $\mu$ l の 0.005M NHS (N-Hydroxysuccinimide) / 0.2M EDC (N-Ethyl-N'--(dimethylaminopropyl)carbodiimide) を添加し、センサーチップ表面に被覆されている CM のカルボキシル基を活性化させた。次いで、5  $\mu$ l のヒト L<sup>OX</sup>-Fc (10  $\mu$ g/ml ; 10mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 中) を添加しヒト L<sup>OX</sup>-Fc をセンサーチップに固定化した。固定化されたヒト L<sup>OX</sup>-Fc の量は、231RU (resonance unit) であった。なお、未反応の活性化されたカルボキシル基は、35  $\mu$ l の 1M Ethanol amine hydrochloride を添加することによりブロックした。

リファレンスとしてのフローセル 2 (Flow Cell 2) は、ヒト L<sup>OX</sup>-Fc を加えないで上記と同様にして処理することによりキャッピングした。

- 59 -

フローセルに、リン酸緩衝液を  $20\mu\text{l}/\text{分}$  の流速で流し、前記実施例で作製した精製抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体 ( $10\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $60\mu\text{l}$ ) を添加した。

測定は、結合相 3 分間及び解離相 10 分間を標準条件として行った。抗体の結合量を経時的に測定しセンサーグラムを得た。得られたセンサーグラムのデータに基づき、キットに付随の解析ソフト (BIAevaluation3.0) を用いて、結合速度定数 ( $k_a$ )、解離速度定数 ( $k_d$ ) 及び解離定数 ( $K_d$ ;  $K_d=k_d/k_a$ ) を算出した。結果を図 4 に示す。

いずれの抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体も、ヒト LOX-1 に対して極めて高い結合親和性及び中和活性を有していた。

#### 実施例 11 各種非ヒト哺乳動物の LOX-1 に対する交叉反応性

前述のようにして調製した抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体のウシ、ブタ及びウサギの各々の LOX-1 に対する交叉反応性の有無を、実施例 1 で調製した該各々の LOX-1 を発現する組換え CHO 細胞を用いて、実施例 4 の酸化 LDL 取込阻害試験と同様にして解析した。

結果を図 8 (ウシ LOX-1 に対する交叉反応性) 及び図 4 (各種非ヒト哺乳動物にの LOX-1 に対する交叉反応性) に示す。

さらに、ウシ、ブタ及びウサギの各々の LOX-1 に対する交叉反応性の有無を、実施例 1 で調製した当該各々の LOX-1 を発現する組換え CHO 細胞を用いて、実施例 3 の細胞 ELISA (その 2) と同様にして解析した。

結果を図 4 に示す。

この結果、本発明の抗ヒト LOX-1 ヒトモノクローナル抗体が、様々な交叉反応性プロファイルを有する抗体であることが示された。

#### 実施例 12 抗 LOX-1 抗体の LPS 誘発血小板減少症に対する治療学的効果

- 6 0 -

Sprague-Dawley ラット（雄 5 乃至 7 週齢、JCL 製）に、生理食塩水にて 1mg/ml に調整した LPS（リポ多糖；Sigma 製）を 3mg/kg の濃度で腹腔内投与して血小板減少症のモデルを作製した。

前記と同様にしてラット LOX-1（Biochem. J., Vol.330, Pt.3, p.1417-1422, 1998; GenBank Accession No.BAA25785, AB005900；配列番号 14 及び配列番号 15）に交叉反応性を有するウシ LOX-1 に対するモノクローナル抗体を作製した。なお、ラット LOX-1 に対する交叉反応性は、実施例 1 で調製した当該ラット LOX-1 を発現する組換え CHO 細胞を用いて、実施例 3 の細胞 ELISA（その 2）と同様にして解析した。

LPS の投与の直後に、生理食塩水にて 1mg/ml に調整した抗 LOX-1 抗体または LOX-1 に反応性を有しない対照抗体を 5mg/kg の濃度で静脈内投与した。また LPS 及び抗体のいずれも投与しないラットを正常対照として用いた。LPS 投与前、並びに LPS 投与から 2 時間後に採血し、自動血球測定装置 Sysmex F800（日本光電製）により血中血小板数を測定した。

結果を図 9 に示す。対照抗体投与群では、LPS 投与から 2 時間後に血小板の減少が起こった。一方、抗 LOX-1 抗体投与群では、その血小板の減少が有意に抑制された。

#### 実施例 13 抗 LOX-1 抗体の LPS 誘発肺障害に対する治療学的効果

Sprague-Dawley ラット（雄 6 乃至 7 週齢、各群 6 匹、SLC 製）に、抗 LOX-1 抗体（2、5、10mg/kg）または生理食塩水（5mg/kg）を静脈内投与した。次いで、ペントバルビタール（30 乃至 50mg/kg, i.p.）で麻酔し、抗体（または生理食塩水）の静脈内投与から 1 時間後に、生理食塩水にて調整した LPS（リポ多糖；Sigma 製）を 1mg/kg の濃度で経気道的に投与した。対照群である正常ラットには生理食塩水を経気道的に投与した。

LPS 投与から 24 時間後に、各ラットをエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈を切断し、放血死させた。次いで、咽頭部を切開し、気道にカットダウンチュー

- 6 1 -

ブ（JMS 製）を挿入した。該チューブを通じて 5ml シリンジで 0.05mM の EDTA を含有する生理食塩水、即ち BALF（肺胞液）回収液（5ml）を注入し 15 回シリンジを往復させて BALF を回収した。回収した BALF を氷冷保存した後、遠心（1000 rpm、10 分、4°C）し、遠心上清をデカントにて除去し、0.5ml の BALF 回収液を加え軽く懸濁させた。この懸濁液に含まれる白血球数を、自動血球測定装置 Sysmex F800（日本光電製）で計測した。

結果を図 10 に示す。抗 L0X-1 抗体投与群では、組織に浸潤する白血球数を抗体濃度依存的に有意に抑制した。驚くべきことに、抗体濃度が 10mg/kg では、白血球の組織浸潤を約 50%阻害した。

#### 実施例 14 抗 L0X-1 抗体の LPS 誘発炎症に対する治療学的効果

Sprague-Dawley ラット（200g、SLC 製）に、抗 L0X-1 抗体（10mg/kg）または生理食塩水（10mg/kg）を静脈内投与した。次いで、抗体（または生理食塩水）の静脈内投与から 1 時間後に、生理食塩水にて調整した LPS（リポ多糖；Sigma 製）を 1mg/kg の濃度で足底に投与した。対照群である正常ラットには生理食塩水を足底に投与した。

LPS 投与から 12 時間後に、各ラットから常法に従って採血し、眼前房に浸潤した白血球数を、自動血球測定装置 Sysmex F800（日本光電製）で計測した。また、眼前房に漏出した総蛋白量を測定した。

結果を図 11 及び図 12 に示す。抗 L0X-1 抗体投与群では、眼前房組織に浸潤する白血球数並びに漏出する蛋白量を有意に抑制した。

#### 実施例 15 抗 L0X-1 抗体の PTCA の術後再狭窄に対する治療学的効果

Sprague-Dawley ラット（雄約 300g、SLC 製）をペントバルビタール（30 乃至 50mg/kg, i.p.）で麻酔した。外科手術により頸動脈及び外頸を露出させ、両動脈を一時的に結合させ血流を一時的に止めた。次いで、外頸動脈に穴を空け、2 F バルーンカテーテル（Baxter 製）を挿入し、0.4ml の空気を送り込み、その圧力で血管を内膜を 3 回擦った。次いで、外頸動脈を縛り、一時的に結合させてお

- 6 2 -

いた頸動脈と内頸動脈を解き血流を再開させた。手術部位を縫い合わせ、直ちに抗 LOX-1 抗体 (10mg/kg) を静脈内投与した。

その後 3 日毎に 4 回ずつ抗体 (10mg/kg) を静脈内投与した。2 週間後、ラットを再度ペントバルビタール (30 乃至 50mg/kg, i.p.) で麻酔し、4%ホルムアルデヒド／リン酸緩衝液で還流固定を行い、頸動脈を取り出した。頸動脈をパラフィンで包埋し、1つのサンプルから6つの切片を作成し、エラスチカ・ワンギーソン染色を行った。NIH analyze system を用いて、各切片の血管内膜の肥厚の状態を評価した。内膜と中膜の面積の比を算出し、有意な肥厚が見られる2つの切片を選びその平均をそのサンプルの肥厚量とした。

結果を図 1 3 に示す。抗 LOX-1 抗体により、PTCA の術後再狭窄が有意に抑制された。

#### 実施例 1 6 抗 LOX-1 抗体の動脈での血栓形成に対する抑制・予防効果

本試験は、光化学的により人工的に血栓形成を誘導したラットモデル (PIT モデル; pPhotochemically-induced thrombosis model) を用いた (J. Pharmacol. Method., Vol.25, p.303, 1991; Thrombo. Res., Vol.63, p.405, 1991 など)。

正常ラットをチオブタバルビタール (100mg/kg, i.p.) で麻酔した。各ラットを背位に固定し、左大腿動脈に血圧測定用のカニユーレを挿入して血圧を連続的に測定した。また、左大腿静脈には、ラジカル誘導剤であるローズベンガル (rose bengal; 20mg/kg) を投与するためのカニユーレを挿入した。さらに、右大腿動脈の末梢部を剥離露出させ、パルスドップラー血流プローブを装着した。

パルスドップラー血流プローブを装着した部位の中枢側約 2 mm の部位に、キセノンランプを用いて波長 540nm の緑色光を照射し、その 5 分後にローズベンガル (20mg/kg) を静脈内投与し、血栓形成を誘導した。10 分後に光照射を中止し、以降 90 分間に亘り、検知される血流音を指標に血栓形成の状態を観察した。

- 6 3 -

この血栓形成に対する抗 L0X-1 抗体の抑制効果の試験のために、キセノンランプの照射の 1 時間前に、前記実施例で調製した抗 L0X-1 モノクローナル抗体 (10 mg/kg) を静脈内投与した。

結果を図 1 4 及び図 1 5 に示す。

抗 L0X-1 抗体により、血栓の形成が有意に抑制された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明のヒト酸化 LDL 受容体 (hL0X-1) に結合するヒトモノクローナル抗体は、ヒトに由来する抗体であることから、マウス由来の抗体等の非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな問題点 (副作用) であったヒトに対する抗原性、即ち HAMA (Human anti-mouse antigenicity) に起因する宿主の重篤な免疫拒絶反応を全く惹起しない (HAMA に起因する宿主の免疫拒絶反応を惹起しない。) ことから、抗体の医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

従って、本発明のヒト酸化 LDL 受容体に対するヒトモノクローナル抗体及び該ヒトモノクローナル抗体からなる医薬組成物、並びに、該酸化 LDL 受容体の生体内リガンドの該酸化 LDL 受容体への結合、または該リガンドの該酸化 LDL 受容体を発現する細胞による取込を阻害する活性を有する物質 (例えば、該ヒトモノクローナル抗体等の種々のモノクローナル抗体、あるいは化学合成低分子化合物など) は、ヒト L0X-1 の生体内リガンド (例えば、酸化 LDL などの変性 LDL、老化赤血球、apoptotic 細胞、活性化血小板など) の L0X-1 への結合及び/または該リガンドの L0X-1 を介する細胞内への取込を阻害することができ、該 L0X-1 リガンドと L0X-1 との相互作用 (結合、取込) に起因する種々の疾患 (例えば、動脈硬化症、血小板減少症、腎疾患、種々の炎症 (例えば、心筋虚血再灌流傷害、経皮的冠動脈血栓溶解術 (PTCR) の術後、または経皮的冠血管形成術 (PTCA) の術後における炎症反応など)、PTCA や PTCR の術後の血管再狭窄など)、血管 (動

- 6 4 -

脈など)における血栓の形成などの疾患または疾患症状の発症及び／または進行を抑制、阻止し、該疾患を治療または予防するための医薬品として有用である。

- 6 5 -

「配列表フリーテキスト」

配列番号：5

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：6

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：7

他の情報：人工配列についての記載：ヒト免疫グロブリン IgG 1 の F c 領域をコードするエクソンからなるゲノミック DNA を含むプラスミド pCd51neg1 のベクターDNA。

配列番号：8

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：9

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

- 6 6 -

請求の範囲

1. ヒト酸化 LDL 受容体に結合するヒトモノクローナル抗体またはその一部。
2. 該ヒトモノクローナル抗体が、酸化 LDL のヒト酸化 LDL 受容体への結合または酸化 LDL のヒト酸化 LDL 受容体を介した細胞内への取込を阻害する活性を有することを特徴とする請求項 1 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。
3. 該ヒトモノクローナル抗体のイムノグロブリンクラスが、I g G 1 または I g G 4 のいずれかであることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。
4. 該ヒトモノクローナル抗体とヒト酸化 LDL 受容体との結合速度定数 ( $k_a$ ) が、 $1.0 \times 10^4$ (1/M.Sec)以上の数値であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。
5. 該ヒトモノクローナル抗体とヒト酸化 LDL 受容体との解離速度定数 ( $k_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-2}$ (1/Sec)以下の数値であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。
6. 該ヒトモノクローナル抗体とヒト酸化 LDL 受容体との解離定数 ( $K_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-6}$ (M)以下の数値であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。
7. 該結合速度定数 ( $k_a$ ) が、 $1.0 \times 10^5$ (1/M.Sec)以上の数値であることを特徴とする請求項 4 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。
8. 該解離速度定数 ( $k_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-4}$ (1/Sec)以下の数値であることを特徴とする請求項 5 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。
9. 該解離定数 ( $K_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-7}$ (M)以下の数値であることを特徴とする請求項 6 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。
10. 該解離定数 ( $K_d$ ) が、 $1.0 \times 10^{-8}$ (M)以下の数値であることを特徴とする請求項 9 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

- 67 -

11. 該ヒトモノクローナル抗体が、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1乃至請求項10のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

12. 該ヒトモノクローナル抗体が、ヒト酸化 LDL 受容体を発現する細胞、該細胞の可溶性膜画分またはヒト酸化 LDL 受容体の全部若しくは一部を、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項11に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

13. 該トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、トランスジェニックマウスであることを特徴とする請求項11または請求項12に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

14. 請求項1乃至請求項13のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を産生する細胞。

15. 該細胞が、該ヒトモノクローナル抗体を産生する能力を哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする請求項14に記載の細胞。

16. 該細胞が、該ヒトモノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする請求項14に記載の細胞。

17. 請求項1乃至請求項13のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

18. 該医薬組成物が、ヒト酸化 LDL 受容体の生体内リガンドの該酸化 LDL 受容体への結合、または該リガンドの該酸化 LDL 受容体を発現する細胞による取込を阻害するために用いられることを特徴とする請求項17に記載の医薬組成物。

- 6 8 -

19. 該医薬組成物が、動脈硬化症の治療に用いられることを特徴とする請求項17に記載の医薬組成物。

20. 該医薬組成物が、該酸化 LDL 受容体への血小板若しくは活性化血小板の結合、または該酸化 LDL 受容体を発現する細胞による血小板若しくは活性化血小板の取込に起因する疾患を治療するために用いられることを特徴とする請求項18に記載の医薬組成物。

21. 該疾患が、血小板減少を伴う疾患であることを特徴とする請求項20に記載の医薬組成物。

22. 該疾患が、腎臓疾患であることを特徴とする請求項20に記載の医薬組成物。

23. 該医薬組成物が、白血球の組織への浸潤を阻害するために用いられることを特徴とする請求項17に記載の医薬組成物。

24. 該白血球の組織への浸潤が、動脈硬化症、心筋虚血再灌流傷害、経皮的冠動脈血栓溶解術 (PTCR) の術後、または経皮的冠血管形成術 (PTCA) の術後における炎症反応で見られるものであることを特徴とする請求項23に記載の医薬組成物。

25. 該医薬組成物が、炎症の治療に用いられることを特徴とする請求項17に記載の医薬組成物。

26. 該炎症が、動脈硬化症、心筋虚血再灌流傷害、経皮的冠動脈血栓溶解術 (PTCR) の術後、または経皮的冠血管形成術 (PTCA) の術後における炎症であることを特徴とする請求項25に記載の医薬組成物。

27. 該医薬組成物が、経皮的冠動脈血栓溶解術 (PTCR) または経皮的冠血管形成術 (PTCA) の術後血管再狭窄の治療に用いられることを特徴とする請求項17に記載の医薬組成物。

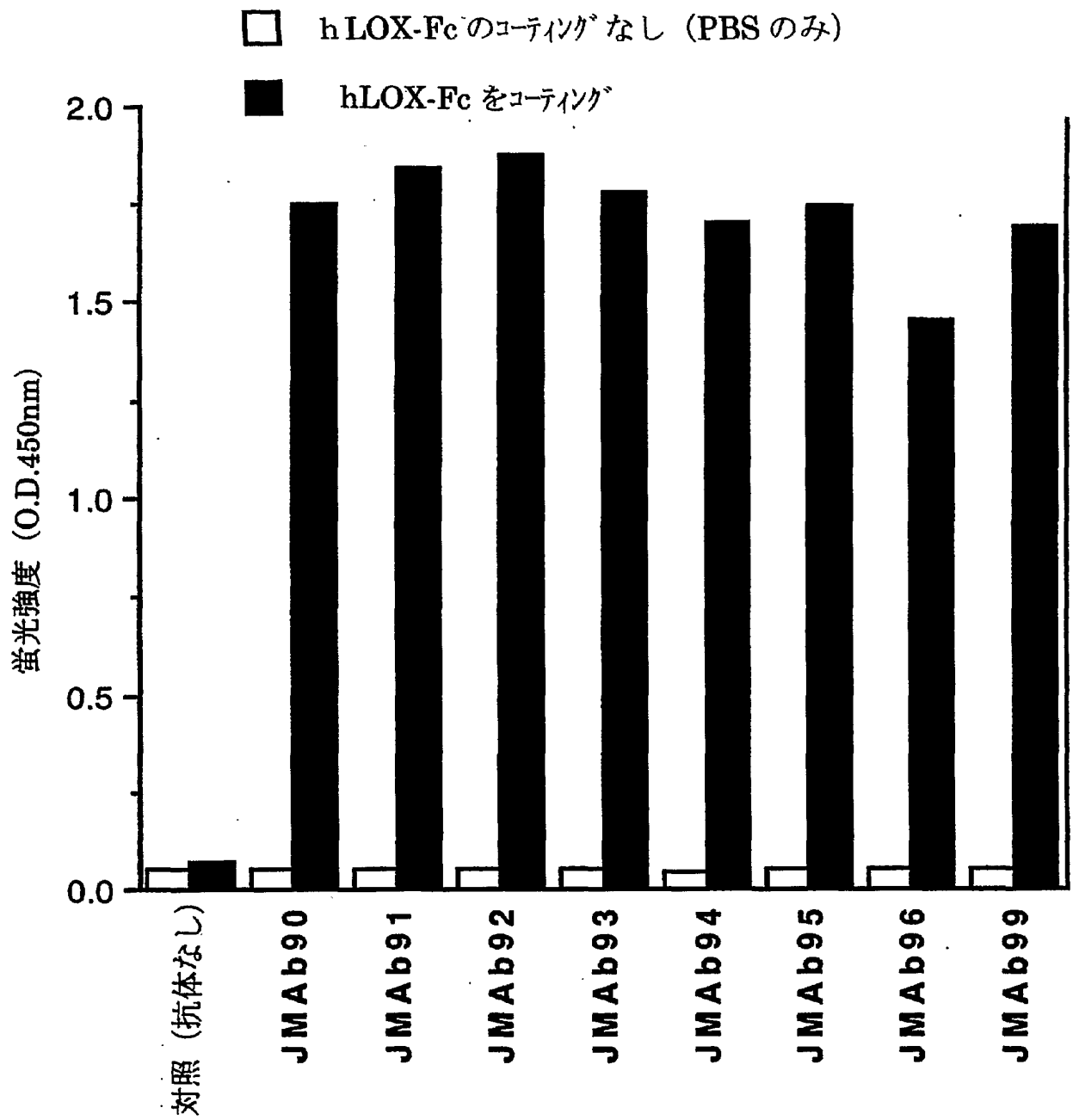
28. ヒト酸化 LDL 受容体の生体内リガンドの該酸化 LDL 受容体への結合、または該リガンドの該酸化 LDL 受容体を発現する細胞による取込を阻害する活性を有する物質を含んでなる血栓形成の抑制または予防のための医薬組成物。

29. 該物質が、ヒト酸化 LDL 受容体に結合するモノクローナル抗体またはその一部であることを特徴とする請求項 28 に記載の医薬組成物。

30. 該モノクローナル抗体またはその一部が、請求項 1 乃至請求項 13 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部であることを特徴とする請求項 29 に記載の医薬組成物。

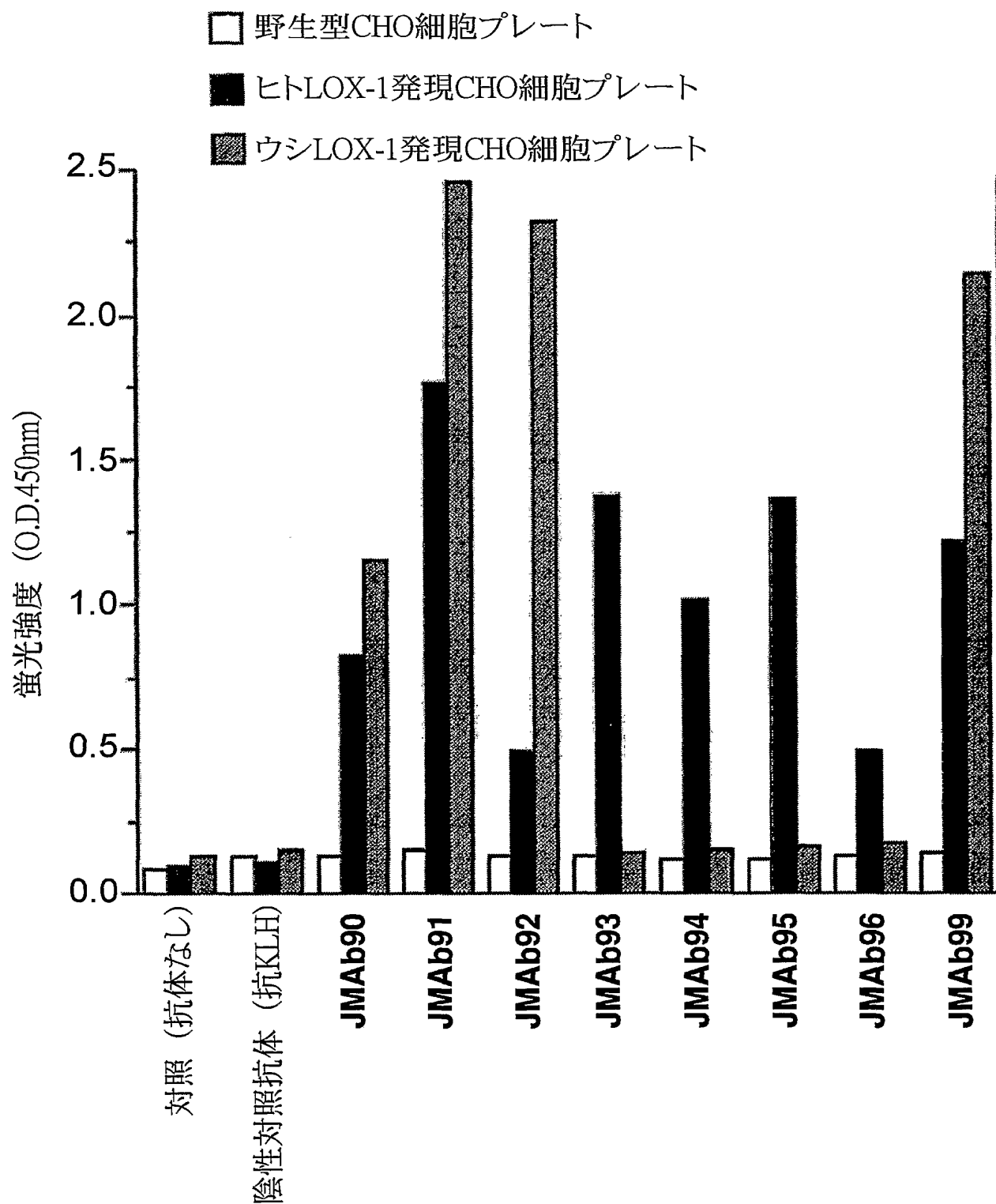
1 / 15

図 1



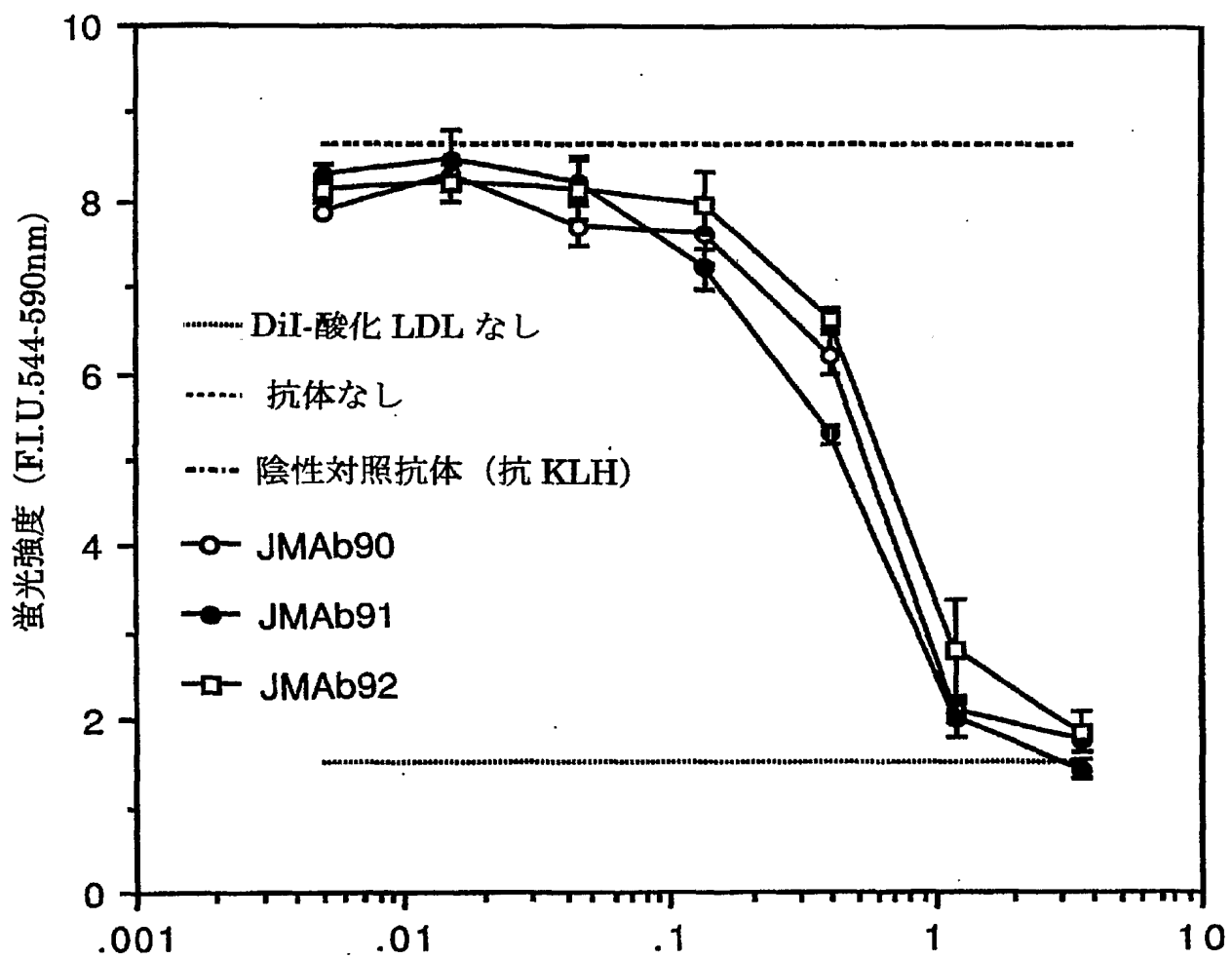
2 / 15

図 2



3 / 15

図 3



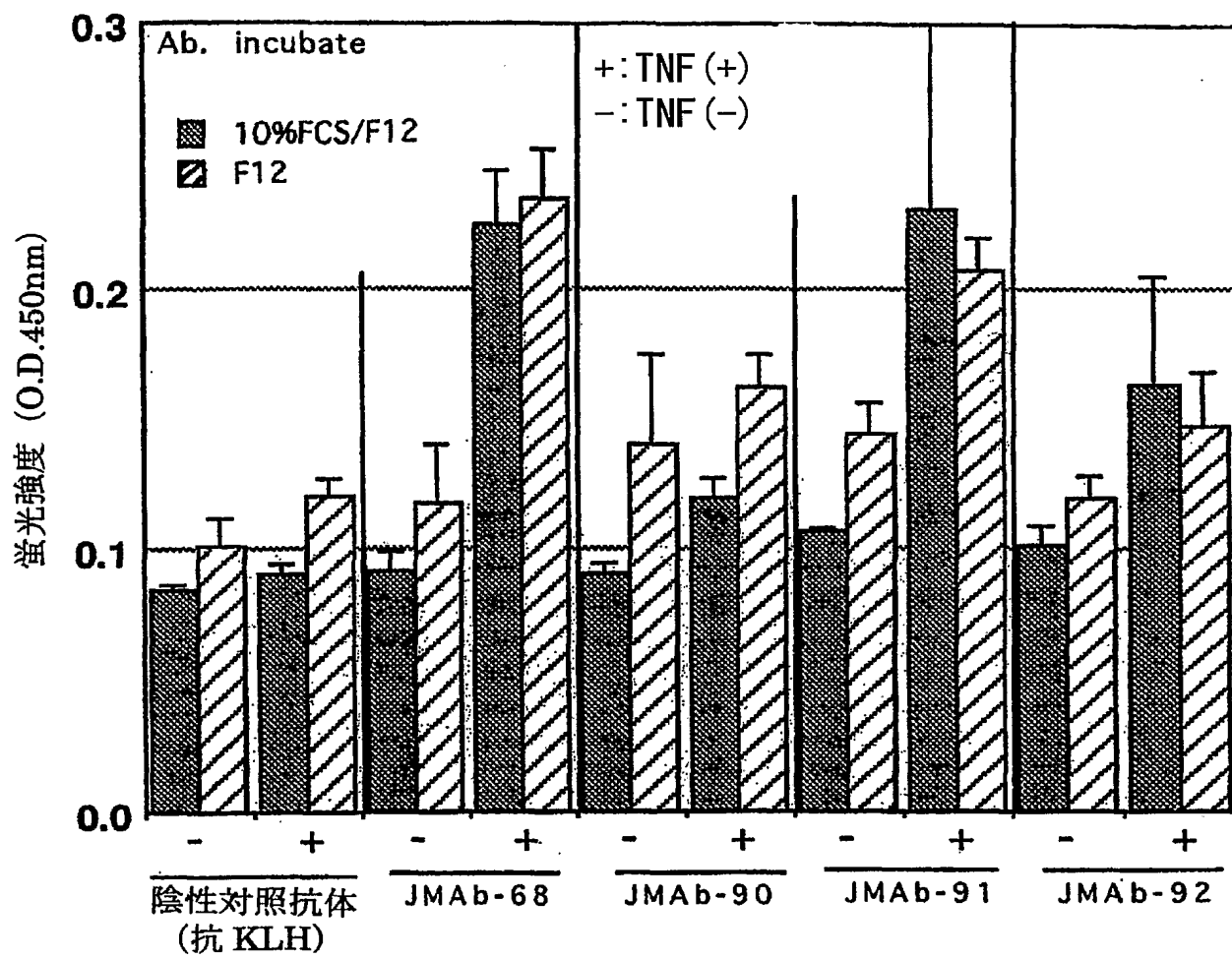
4 / 15

図 4

JMab	clone	Isotype	ELISA			Uptake inhibition (取込阻害)					Kd(M) (解離定数)		
			ヒト	ウシ	フタ	ウサギ	ヒト	ウシ	フタ	ウサギ	HeLa	hLox-Fc	bLox-Fc
90	LXP105-1-1	hlgG2,k	○	○	X	○	○	X		○	○	2.1x10-8	no binding
91	LXP291-A2-1	hlgG2,k	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1.7x10-8	2.4x10-8
92	LXP607-5-1	hlgG2,k	○	○	○	○	○	○	○	○	○	2.4x10-9	3.9x10-8
93	LXP109-5-1	hlgG2,k	○	X	X	○	○			○	○	2.5x10-8	
94	LXP230-1-1	hlgG2,k	○	X	X	○	○			○	○	2.4x10-8	
95	LXP479-1-1	hlgG2,k	○	X	X	○	○			○	○	2.7x10-8	
96	LXP544-1-1	hlgG2,k	○	X	X	X	○			○	○	8.3x10-8	
98	LXR44-1-1	hlgG2,k	○	X	X	X	○			○	○	8.6x10-8	
99	LXR89-1-1	hlgG2,k	○	○	X	○	○	○		○	○	6.8x10-9	
100	LXp163-2-2	hlgG4,k	○	X	X	○	○			X	○	4.4x10-8	
101	LXp267-4-1	hlgG4,k	○	○	○	△	○	X	X	X	○		
102	LXP36-3-1	hlgG2,k	○	○	○	○	○	△	○	○	○	7.8x10-9	
103	LXP299-2-4	hlgG2,k	○	X	X	X	○				○	2.0x10-7	
104	LXR147-3-1	hlgG2,k	○	X	X	○	○			○	○	3.9x10-8	
105	LXp114-8-4	hlgG4,k	○	X	X	X	○				○	7.5x10-9	
106	LXP486-2-2	hlgG2,k	○	X	X	X	○			X	○	4.8x10-8	
107	LXR11-1-1	hlgG2,k	○	X	X	X	○				○	1.7x10-8	
108	LXR155-1-1	hlgG2,k	○	X	X	X	○				○	4.3x10-9	
111	LXP140-1-1	hlgG2,k	○	○	X	○	○	△		○	○	3.1x10-8	
112	LXP464-1-1	hlgG2,k	○	○	X	○	○	X		○	○	2.1x10-8	
113	LXR340-8-3	hlgG2,k	○	X	X	X	○				○	1.7x10-8	
114	LXS49-1-4	hlgG2,k	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1.6x10-8	
115	LXS59-1-6	hlgG2,k	○	○	○	○	○	○	○	○	○	7.4x10-9	
116	LXS130-1-1	hlgG2,k	○	X	X	○	○			○	○	7.0x10-8	
117	LXS260-1-1	hlgG2,k	○	X	X	○	○			X	○	1.3x10-8	
118	LXP262-3-2	hlgG2,k	○	○	X	○	○	X		○	○	3.7x10-8	
119	LXP313-3-1	hlgG2,k	○	○	X	○	○	X		○	○	3.3x10-8	
121	LXS279-1-1	hlgG2,k	○	X	X	○	○			X	○	6.1x10-8	
122	LXp165-2-1	hlgG4,k	○	X	X	X	○				○	2.2x10-8	
123	LXp171-11-14	hlgG4,k	○	X	X	○	○			X	○		
132	LXS68-12-5	hlgG2,k	○	(△)	X	X	○				○	1.1x10-7	
134	LXP147-2-1	hlgG2,k	○	○	X	○	○	X		○	○	4.6x10-8	

5 / 15

図 5



6 / 15

図 6

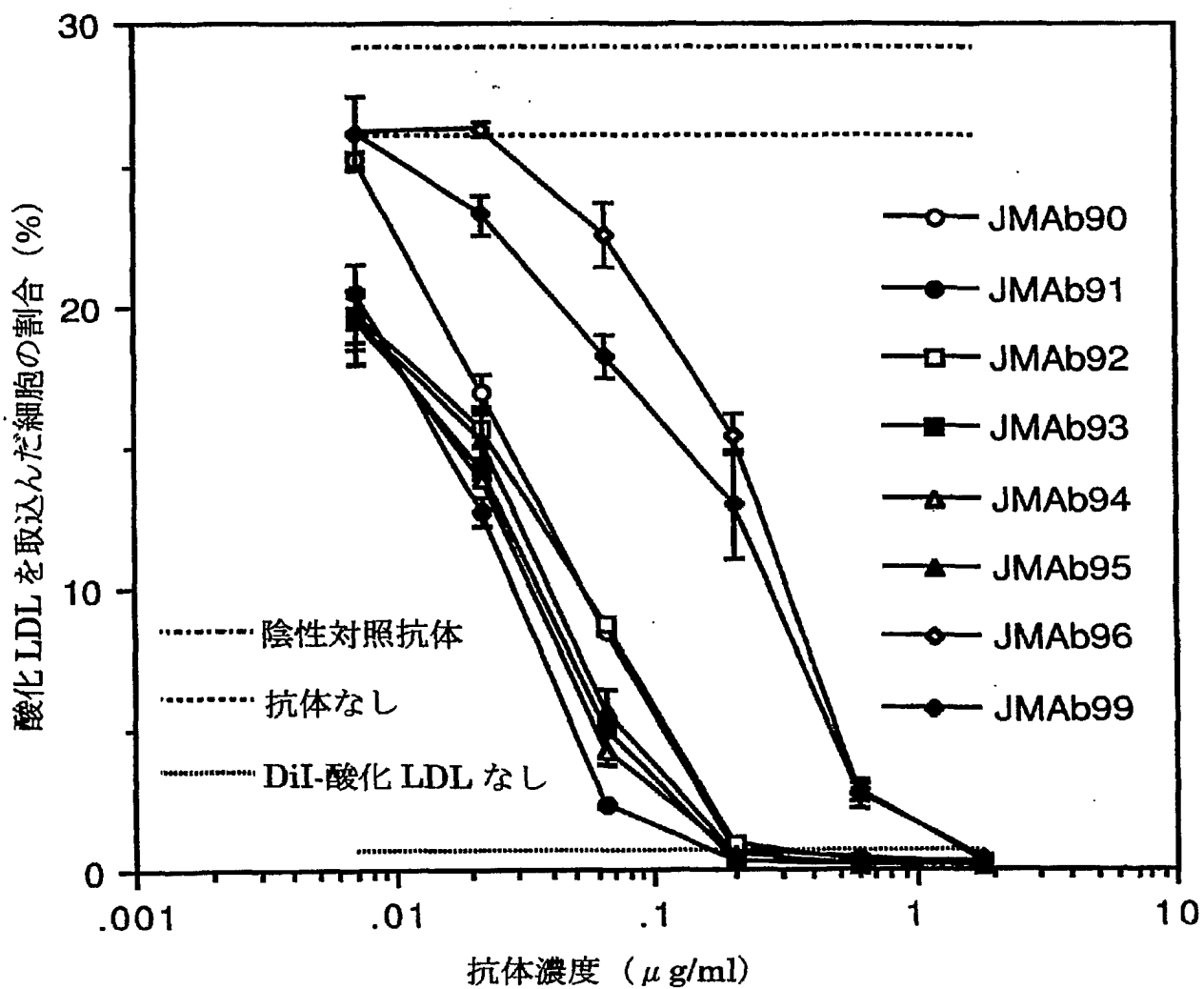
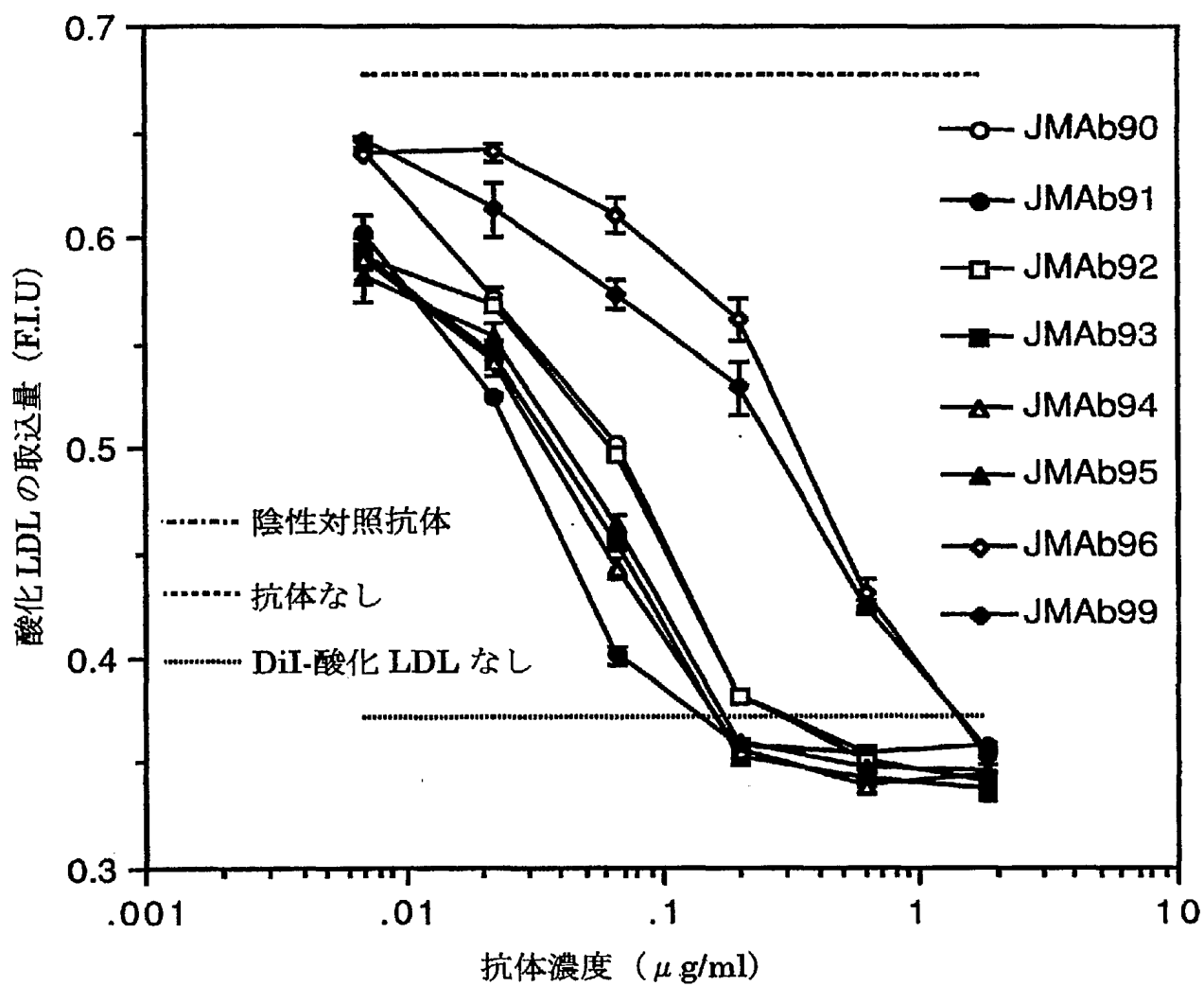
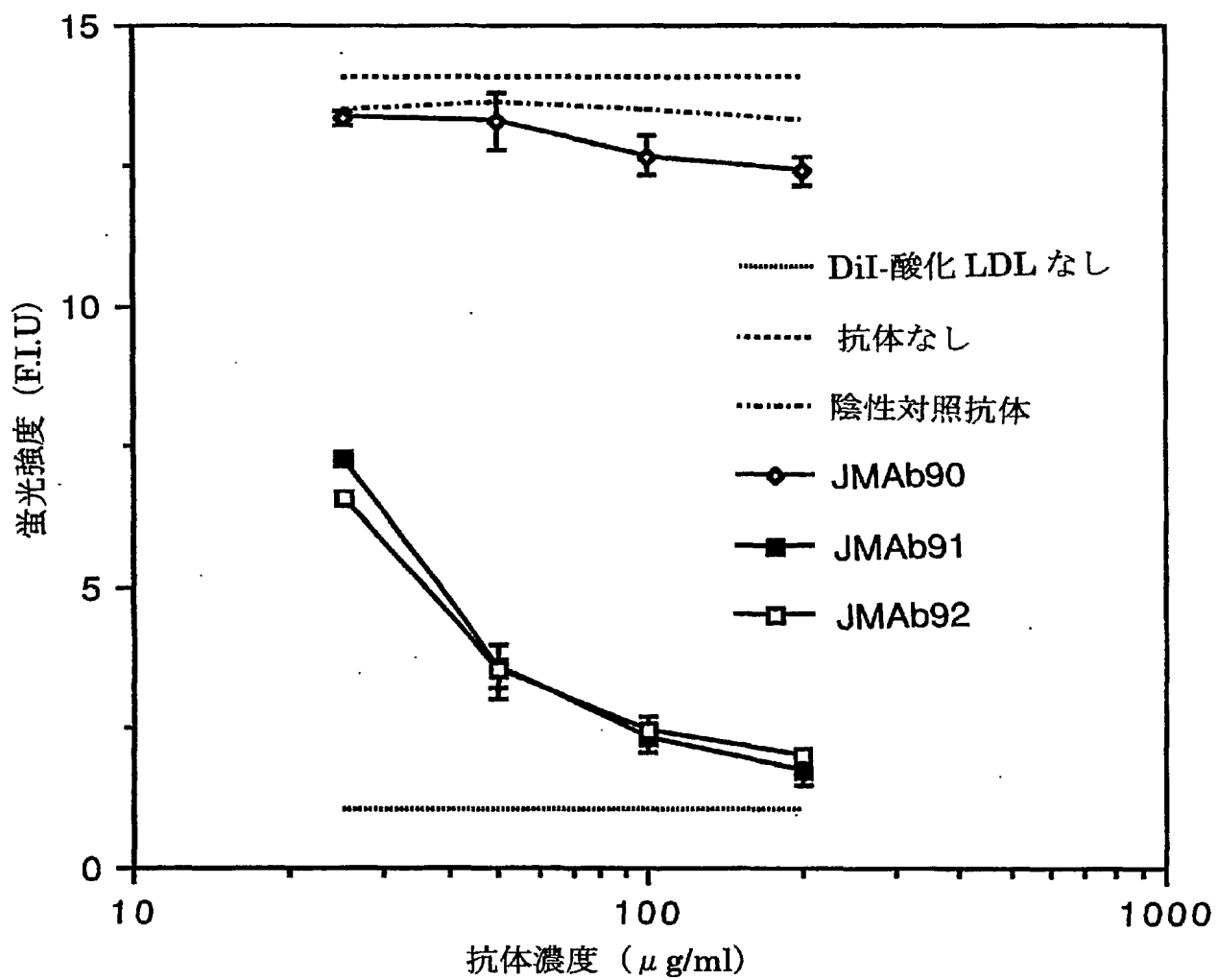


図 7



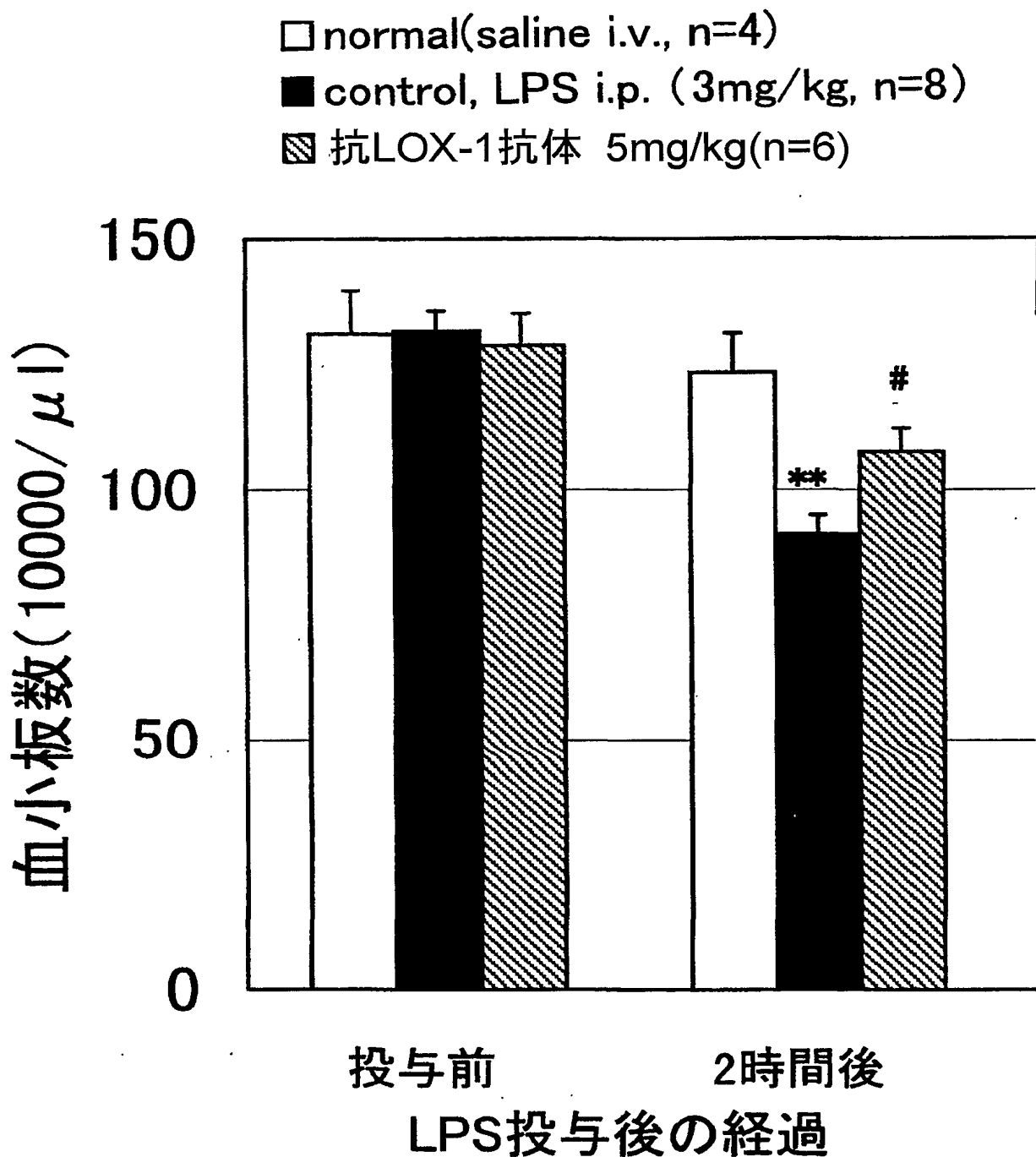
8 / 15

図 8



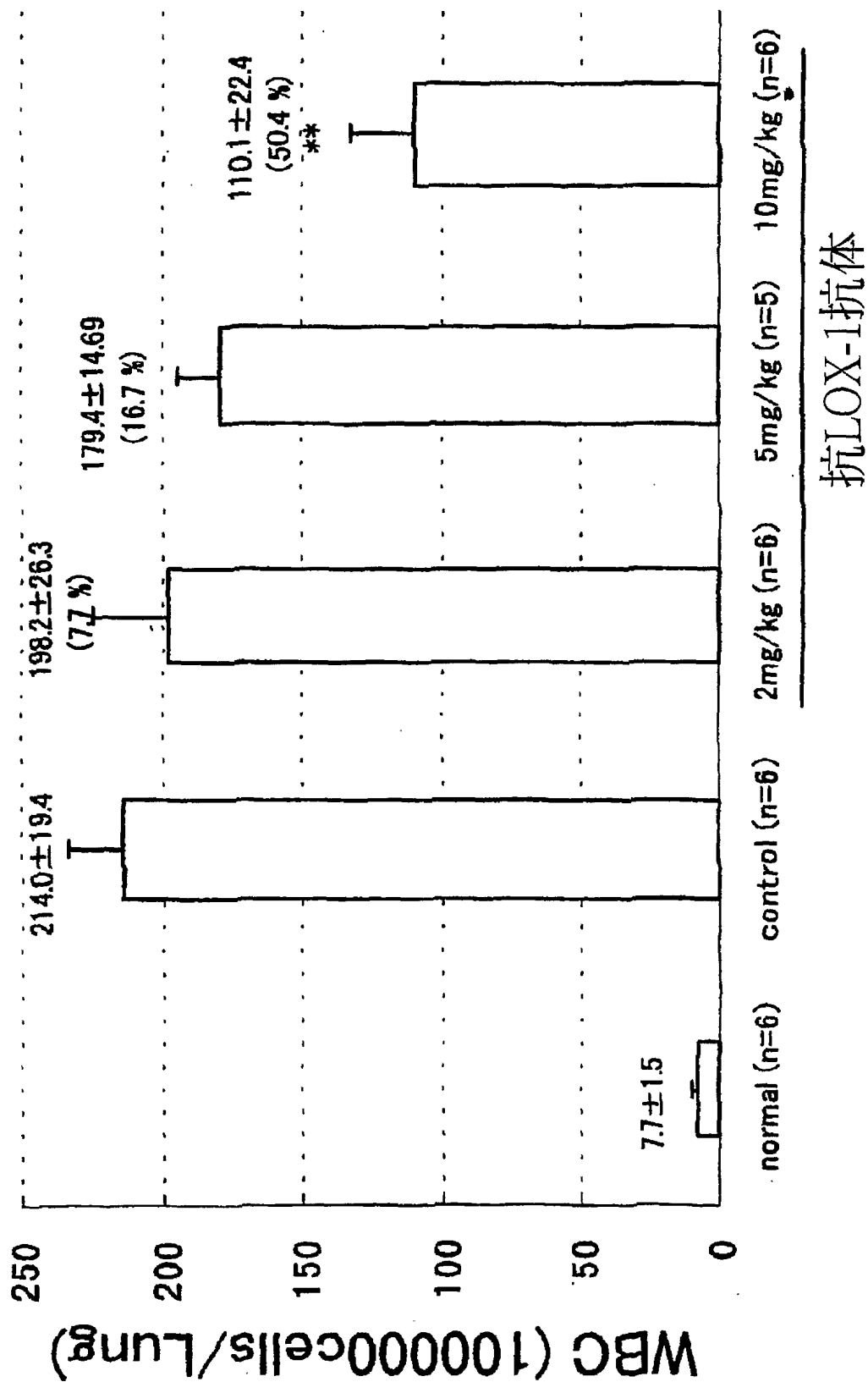
9 / 15

図 9



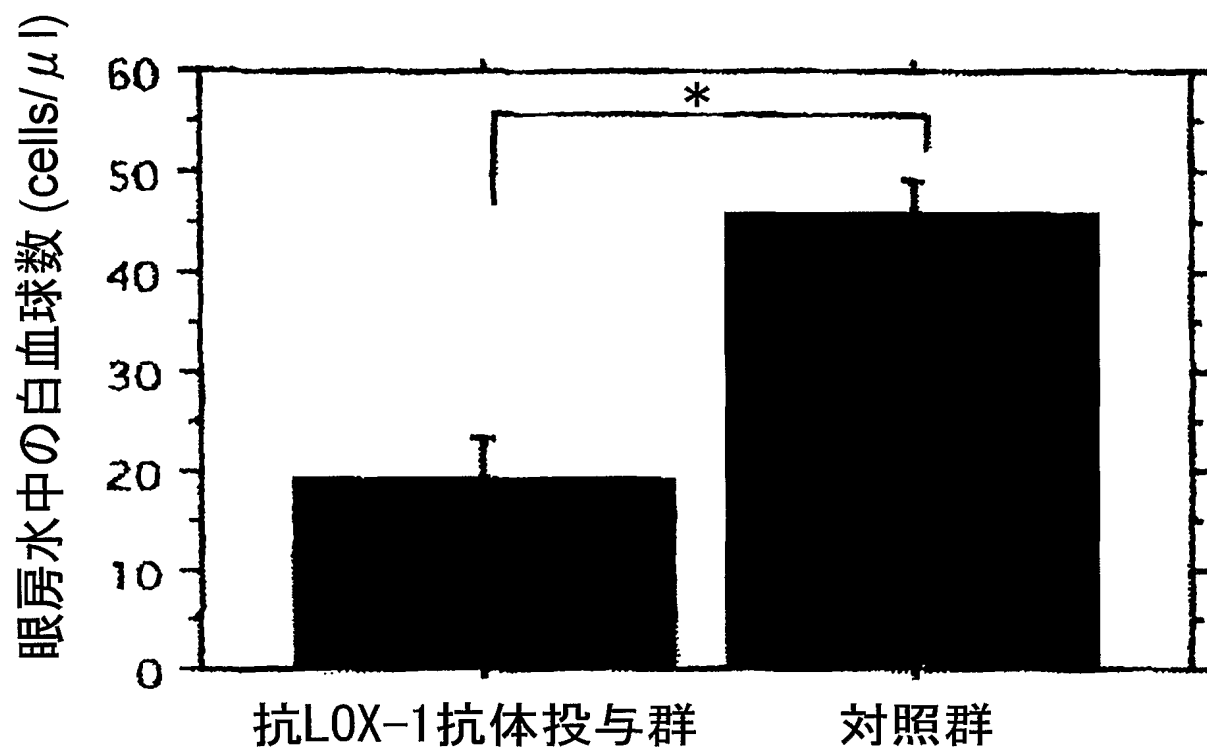
10 / 15

図 10



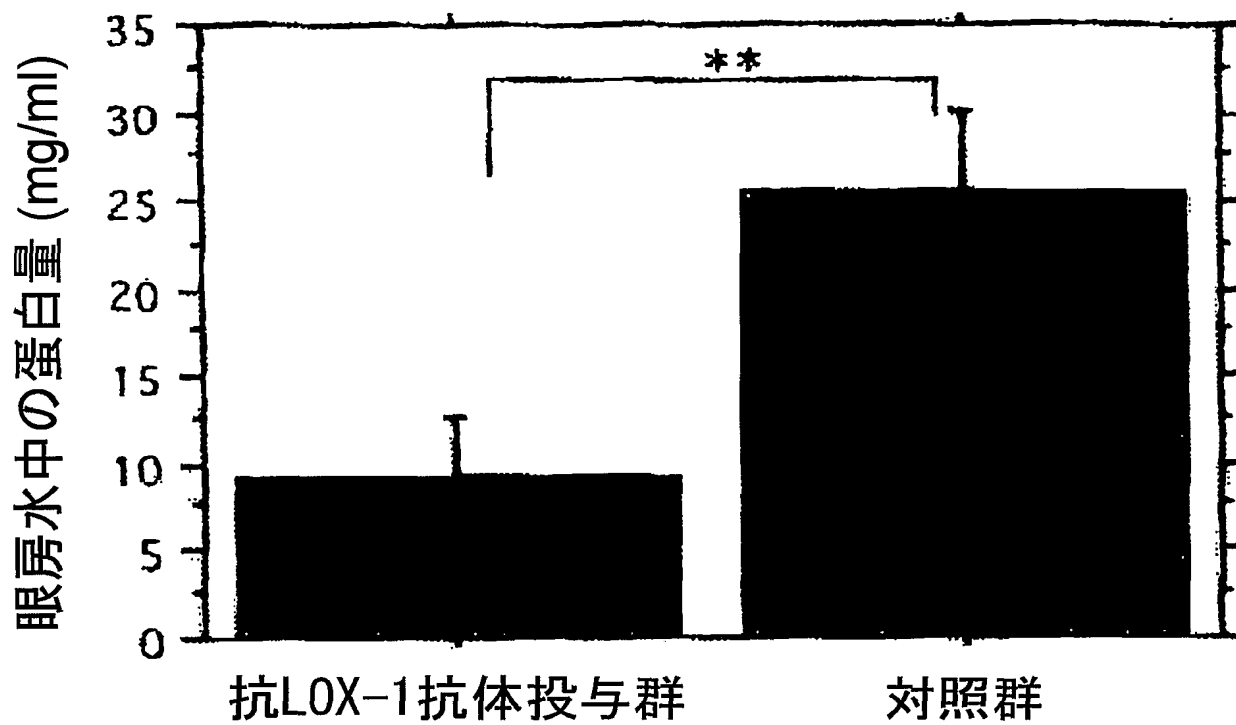
11/15

図 11



12 / 15

図 12



13 / 15

図 13

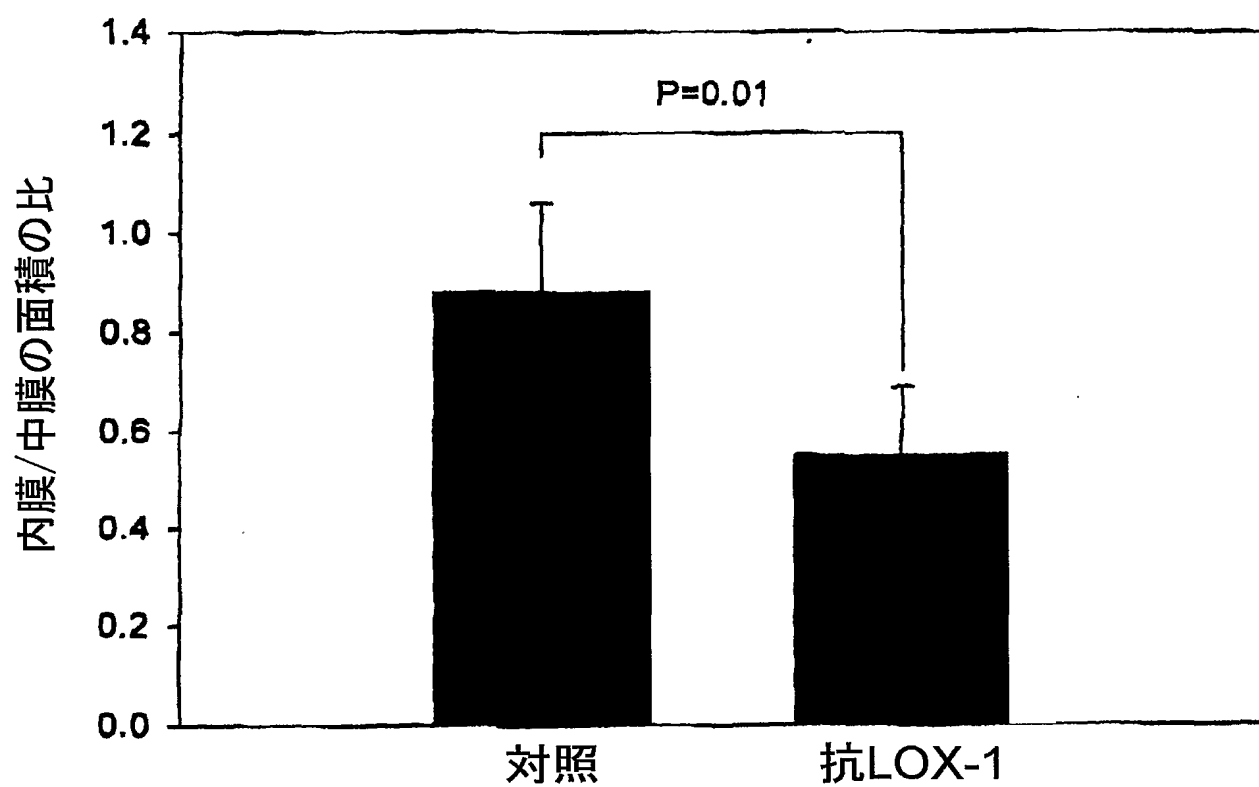


図 1 4

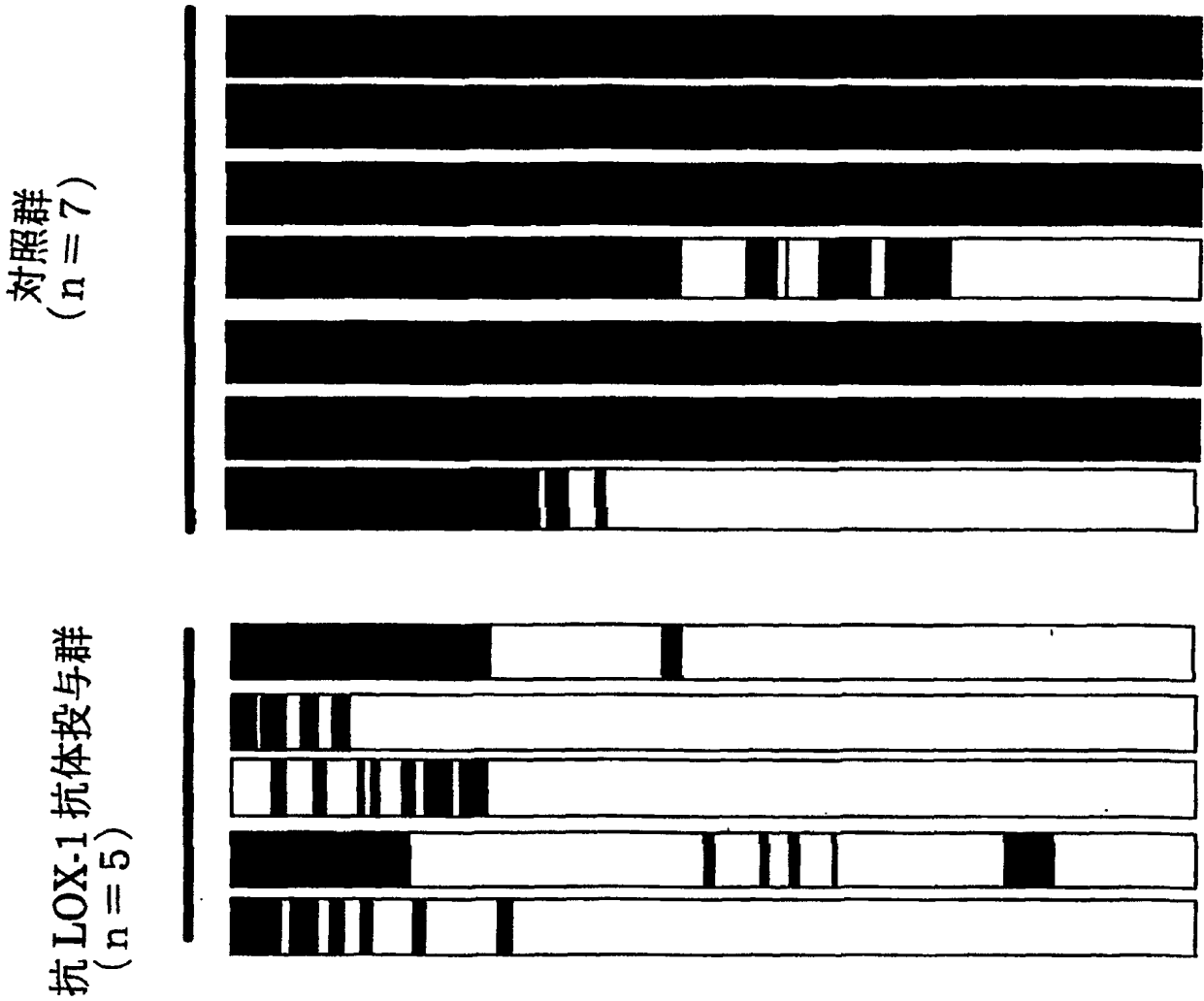
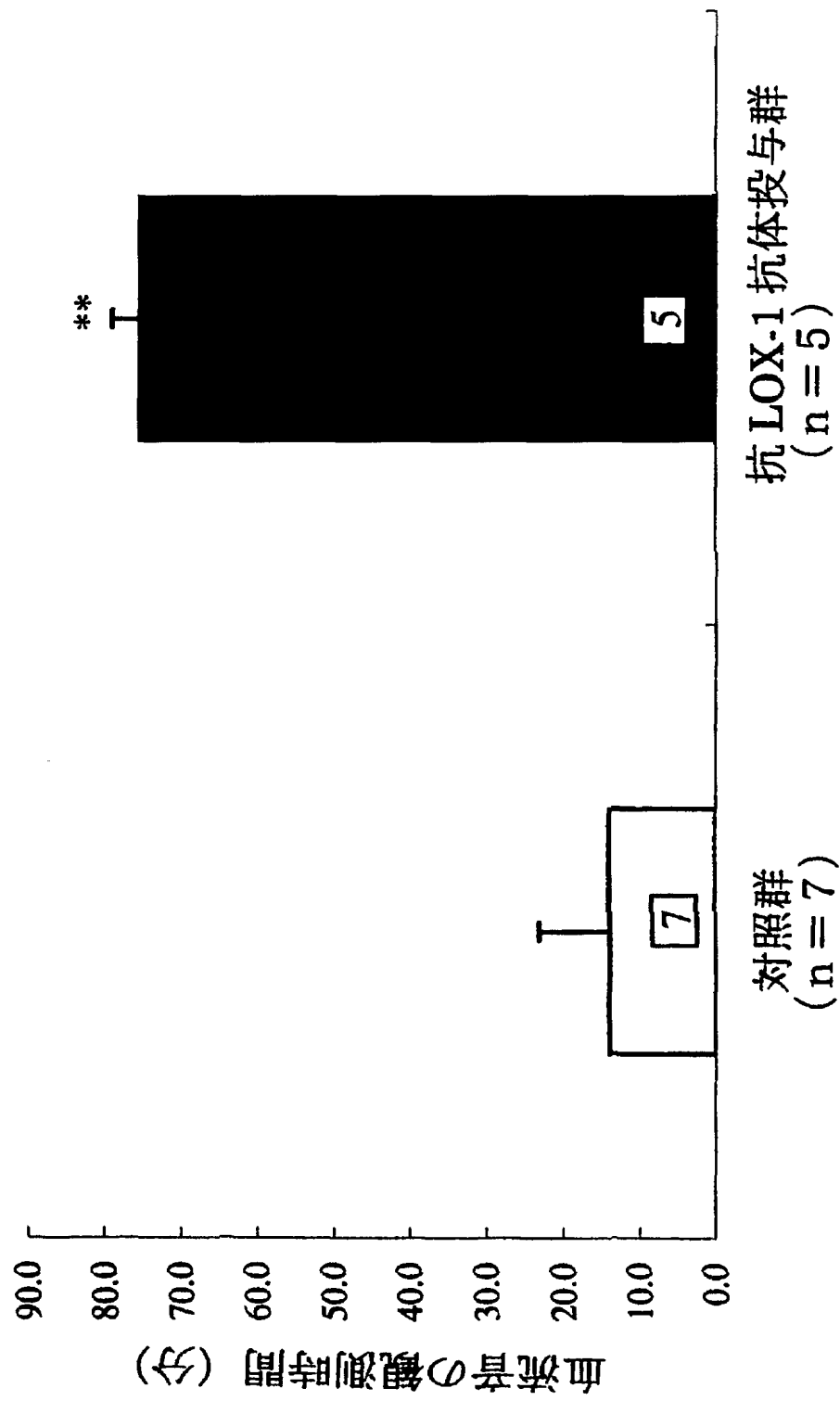


図 1 5



1 / 4 1

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco, Inc.

<120> Human Monoclonal Antibody For Oxidized LDL Receptor And  
Pharmaceutical Use Thereof

<130> ABG-A0101Y1P

<140>

<141>

<150> JP P2000-57745

<151> 2000-03-02

<150> JP P2000-333116

<151> 2000-10-31

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2468

<212> DNA

<213> Homo sapiens

2 / 4 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1)..(61)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (62)..(883)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (884)..(2468)

&lt;400&gt; 1

atttttagtt tgttgaagtt cgtgactgct tcactctctc attcttagct tgaatttgga 60

a atg act ttt gat gac cta aag atc cag act gtg aag gac cag cct gat 109

Met Thr Phe Asp Asp Leu Lys Ile Gln Thr Val Lys Asp Gln Pro Asp

1

5

10

15

gag aag tca aat gga aaa aaa gct aaa ggt ctt cag ttt ctt tac tct 157

Glu Lys Ser Asn Gly Lys Lys Ala Lys Gly Leu Gln Phe Leu Tyr Ser

20

25

30

cca tgg tgg tgc ctg gct gct gcg act cta ggg gtc ctt tgc ctg gga 205

Pro Trp Trp Cys Leu Ala Ala Ala Thr Leu Gly Val Leu Cys Leu Gly

3 / 4 1

35	40	45	
tta gta gtg acc att atg gtg ctg ggc atg caa tta tcc cag gtg tct			253
Leu Val Val Thr Ile Met Val Leu Gly Met Gln Leu Ser Gln Val Ser			
50	55	60	
gac ctc cta aca caa gag caa gca aac cta act cac cag aaa aag aaa			301
Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His Gln Lys Lys Lys			
65	70	75	80
ctg gag gga cag atc tca gcc cgg caa caa gca gaa gaa gct tca cag			349
Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu Glu Ala Ser Gln			
85	90	95	
gag tca gaa aac gaa ctc aag gaa atg ata gaa acc ctt gct cgg aag			397
Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala Arg Lys			
100	105	110	
ctg aat gag aaa tcc aaa gag caa atg gaa ctt cac cac cag aat ctg			445
Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met Glu Leu His His Gln Asn Leu			
115	120	125	
aat ctc caa gaa aca ctg aag aga gta gca aat tgt tca gct cct tgt			493
Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val Ala Asn Cys Ser Ala Pro Cys			
130	135	140	

4 / 4 1

ccg caa gac tgg atc tgg cat gga gaa aac tgt tac cta ttt tcc tcg 541

Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr Leu Phe Ser Ser

145 150 155 160

ggc tca ttt aac tgg gaa aag agc caa gag aag tgc ttg tct ttg gat 589

Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser Leu Asp

165 170 175

gcc aag ttg ctg aaa att aat agc aca gct gat ctg gac ttc atc cag 637

Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu Asp Phe Ile Gln

180 185 190

caa gca att tcc tat tcc agt ttt cca ttc tgg atg ggg ctg tct cgg 685

Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Arg

195 200 205

agg aac ccc agc tac cca tgg ctc tgg gag gac ggt tct cct ttg atg 733

Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Met

210 215 220

ccc cac tta ttt aga gtc cga ggc gct gtc tcc cag aca tac cct tca 781

Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr Pro Ser

225 230 235 240

ggt acc tgt gca tat ata caa cga gga gct gtt tat gcg gaa aac tgc 829

Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu Asn Cys

5 / 4 1

245

250

255

att tta gct gcc ttc agt ata tgt cag aag aag gca aac cta aga gca 877

Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala

260

265

270

cag tga atttgaaggc tctggaagaa aaggaaaaag tctttgagtt ttattctgga 933

Gln

atttaagcta ttctttgtca cttgggtgcc aaacatgaga gccagaaaa ctgtcattta 993

gctggctgca gaactccttt gcagaaactg gggttccagg tgccctggcac ctttatgtca 1053

acatttttga ttctagctat ctgtattatt tcacctagct tgtcccaagc ttccctgcca 1113

gcctgaagtc cattttcecc tttttatttt aaaatttgac tcctcttcaa gcttgaaaac 1173

cctctgaact cagtcttctt tacctcatta tcaccttccc ctcacactcc taaaattgca 1233

tgaagacag aacatggaga acttgctcaa gtgcaggcag agagcaaaaa ggggaaatat 1293

gtctgggaaa aagtgcacgt gaagaaacaa agaaggacag aggccattcc gaaatcaaga 1353

aactcatgtt ctttaacttta aaaaaggtat caatccttgg tttttaaaact gtggtccatc 1413

tccagactct accacttacg gacagacaga cagacagaca cacacacaca cacacacaca 1473

6 / 4 1

cacacacaca ttttgggaca agtgggggagc ccaagaaagt aattagtaag tgagtgggtct 1533

tttctgtaag ctaatccaca acctgttacc acttcctgaa tcagttatta tttcttcatt 1593

tttttttcta ccagaggaca gattaataga ttttaaccctt cacaacagtt cttgttagaa 1653

tcatgggatg tgtggcccag aggtaagaat agaatttctt tccctaaaga acataccttt 1713

tgtagatgaa ctcttctcaa ctctgttttg ctatgctata attccgaaac atacaagaca 1773

aaaaaaatga agacactcaa tctagaacaa actaagccag gtatgcaaat atcgctgaat 1833

agaaacagat ggaattagaa atatatcttc tatttttagg cttctatttc ctttccaccc 1893

actcttcaca ggctattcta ctttaaagga agccttttta ttttgctgca cacaatctag 1953

caggaatctt tttttttttt taagagctgt gtcacctta tgtaggcaag agatgtttgc 2013

tttggttaaa agctttattg agatataatt aacataaaat aaactgaaca tattttaaagt 2073

gtactatttg ataagttttc acaccttggtg gagaacatgc atactacaat taagagagtg 2133

aacatatcca tcatccctca aagtgtcaca atgctcctcc tgatgactcc tccccagaaa 2193

accaccaatc ggctttcatt ttgcattttg tagttttatg tgaatggaat catatagtat 2253

7 / 4 1

gtcttttttt tttgtctggc ttctttcact ttgcataatt attttgagat tcatatgtct 2313

ccatcttgat gctcgatatga attcattctt ttaaagtgtg aatattccct tgtatggata 2373

taccacaatt catttaccca ttacttggt gatgacattt gggttgtttt agttttggga 2433

tattacaaat aaagctgctg tgaacatttg tgtac 2468

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 273

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Thr Phe Asp Asp Leu Lys Ile Gln Thr Val Lys Asp Gln Pro Asp

1 5 10 15

Glu Lys Ser Asn Gly Lys Lys Ala Lys Gly Leu Gln Phe Leu Tyr Ser

20 25 30

Pro Trp Trp Cys Leu Ala Ala Ala Thr Leu Gly Val Leu Cys Leu Gly

35 40 45

Leu Val Val Thr Ile Met Val Leu Gly Met Gln Leu Ser Gln Val Ser

50 55 60

Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His Gln Lys Lys Lys

65 70 75 80

8 / 4 1

Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu Glu Ala Ser Gln  
                     85                            90                            95  
 Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala Arg Lys  
                     100                            105                            110  
 Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met Glu Leu His His Gln Asn Leu  
                     115                            120                            125  
 Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val Ala Asn Cys Ser Ala Pro Cys  
                     130                            135                            140  
 Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr Leu Phe Ser Ser  
 145                            150                            155                            160  
 Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser Leu Asp  
                     165                            170                            175  
 Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu Asp Phe Ile Gln  
                     180                            185                            190  
 Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Arg  
                     195                            200                            205  
 Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Met  
                     210                            215                            220  
 Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr Pro Ser  
 225                            230                            235                            240  
 Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu Asn Cys  
                     245                            250                            255  
 Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala  
                     260                            265                            270  
 Gln

9 / 4 1

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1879

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bos taurus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1)..(34)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (35)..(847)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (848)..(1879)

&lt;400&gt; 3

gcttcactct ctcattcttg gaatacattt gaaa atg act gtt gat gac ccc aag 55

Met Thr Val Asp Asp Pro Lys

1

5

ggt atg aaa gat caa ctt gat cag aag cca aat ggc aag aca gca aaa 103

Gly Met Lys Asp Gln Leu Asp Gln Lys Pro Asn Gly Lys Thr Ala Lys

1 0 / 4 1

10	15	20	
ggt ttt gtt tcc tct tgg agg tgg tac cct gct gct gtg act cta ggg 151			
Gly Phe Val Ser Ser Trp Arg Trp Tyr Pro Ala Ala Val Thr Leu Gly			
25	30	35	
gtc ctt tgt ctg gga tta ctg gtg act gtt ata ttg ttg ata ctg caa 199			
Val Leu Cys Leu Gly Leu Leu Val Thr Val Ile Leu Leu Ile Leu Gln			
40	45	50	55
tta tcc cag gtc tct gat ctc ata aag aaa cag caa gca aat att act 247			
Leu Ser Gln Val Ser Asp Leu Ile Lys Lys Gln Gln Ala Asn Ile Thr			
	60	65	70
cac cag gaa gat atc ctg gag gga cag att tta gcc cag cgc cga tca 295			
His Gln Glu Asp Ile Leu Glu Gly Gln Ile Leu Ala Gln Arg Arg Ser			
75	80	85	
gaa aaa tct gcc cag gag tca cag aag gaa ctc aaa gaa atg ata gaa 343			
Glu Lys Ser Ala Gln Glu Ser Gln Lys Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu			
90	95	100	
acc ctt gcc cac aag ctg gat gag aaa tcc aag aaa cta atg gaa ctt 391			
Thr Leu Ala His Lys Leu Asp Glu Lys Ser Lys Lys Leu Met Glu Leu			
105	110	115	

1 1 / 4 1

cac cgc cag aac ctg aat ctc caa gaa gtt ctg aaa gag gca gca aac 439

His Arg Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu Val Leu Lys Glu Ala Ala Asn

120

125

130

135

tat tca ggt cct tgt ccc caa gac tgg ctc tgg cat gaa gaa aac tgt 487

Tyr Ser Gly Pro Cys Pro Gln Asp Trp Leu Trp His Glu Glu Asn Cys

140

145

150

tac caa ttt tcc tct ggc tct ttt aat tgg gaa aaa agc cag gag aac 535

Tyr Gln Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Asn

155

160

165

tgc ttg tct ttg gat gcc cac ttg ctg aag att aat agc aca gat gaa 583

Cys Leu Ser Leu Asp Ala His Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Asp Glu

170

175

180

ctg gaa ttc atc cag caa atg att gcc cat tcc agt ttc ccc ttc tgg 631

Leu Glu Phe Ile Gln Gln Met Ile Ala His Ser Ser Phe Pro Phe Trp

185

190

195

atg ggg ttg tca atg agg aaa ccc aat tac tcg tgg ctt tgg gaa gat 679

Met Gly Leu Ser Met Arg Lys Pro Asn Tyr Ser Trp Leu Trp Glu Asp

200

205

210

215

ggt act cct ttg acg ccc cac ttg ttt aga att cag gga gct gtt tcc 727

Gly Thr Pro Leu Thr Pro His Leu Phe Arg Ile Gln Gly Ala Val Ser

1 2 / 4 1

220

225

230

cgt atg tat cct tca ggg acc tgt gca tat att caa agg gga act gtt 775

Arg Met Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Thr Val

235

240

245

ttt gct gaa aac tgc att tta act gca ttc agt ata tgt caa aag aag 823

Phe Ala Glu Asn Cys Ile Leu Thr Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys

250

255

260

gcg aat cta ttg aga gca cag tga atttgaagga tctggaggaa aagaaggaaa 877

Ala Asn Leu Leu Arg Ala Gln

265

270

cctttgaatt ctcttctgga atttaagcta tacttcatca cttagatgta aaccattaga 937

gcccaggga atgcctgcta ctggttgagt gcagaactcc ttagcagaga ctggcccagc 997

tgcctggcac cttgatagca aaagttgcaa ttccctctgt atatTTTTcc ctaacttggt 1057

ccaagtcctc cctgcagga cttcagagaa gtcaatTTTT ctgtttccat tgtttctaag 1117

aacttggtgc ctaactcaag gtcacagcat ttttctcact tttgtcctat gctttcttct 1177

aggcattgta gagttttaga ttttcatgg aaatctagaa cttatTTTtag attaatttct 1237

1 3 / 4 1

aagtgatata tggatgtatg gaagttttct gtttgttttt tgcttgtgag tattcaattg 1297

tttttgaac atttgctgaa aagactattc ttccttcact acattgcctt tgcactgttg 1357

tcaacaatta tccatacatg cctggctcta tttctggatt ttctattcct ttccatttat 1417

ttatttatta ttcttggctt acaacatcac catgatattt tgaattctat ggttctttta 1477

tatatcttgg aatcacatgg tagtagttat tcattgttgt tcttttttag agttgtttgg 1537

ttaatctatg cttttgtatt tctgtcttaa attggcttgt ccatttctaa aaaaacttga 1597

aattttgaat tgcactgaat ccatacataa atttagggaa aattgaattc ttaaaaatac 1657

tgatttggtc aactcatgaa aaaggtgtat tgctctattt aggtattcct tattttcttt 1717

aagcaatgct ttttaatggt ctttgtgtag atattgtag attatcatca tgtatttcac 1777

attatttatg ctactgtaga tagtattggt atcatttggt gttcttattt tcaaagtctt 1837

ctgctagtat gtagaattat aataaagttt gatattaata tt 1879

<210> 4

<211> 270

<212> PRT

1 4 / 4 1

&lt;213&gt; Bos taurus

&lt;400&gt; 4

```

Met Thr Val Asp Asp Pro Lys Gly Met Lys Asp Gln Leu Asp Gln Lys
  1             5             10             15
Pro Asn Gly Lys Thr Ala Lys Gly Phe Val Ser Ser Trp Arg Trp Tyr
      20             25             30
Pro Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Leu Cys Leu Gly Leu Leu Val Thr
      35             40             45
Val Ile Leu Leu Ile Leu Gln Leu Ser Gln Val Ser Asp Leu Ile Lys
      50             55             60
Lys Gln Gln Ala Asn Ile Thr His Gln Glu Asp Ile Leu Glu Gly Gln
      65             70             75             80
Ile Leu Ala Gln Arg Arg Ser Glu Lys Ser Ala Gln Glu Ser Gln Lys
      85             90             95
Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala His Lys Leu Asp Glu Lys
      100            105            110
Ser Lys Lys Leu Met Glu Leu His Arg Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu
      115            120            125
Val Leu Lys Glu Ala Ala Asn Tyr Ser Gly Pro Cys Pro Gln Asp Trp
      130            135            140
Leu Trp His Glu Glu Asn Cys Tyr Gln Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn
      145            150            155            160
Trp Glu Lys Ser Gln Glu Asn Cys Leu Ser Leu Asp Ala His Leu Leu
      165            170            175
Lys Ile Asn Ser Thr Asp Glu Leu Glu Phe Ile Gln Gln Met Ile Ala

```

1 5 / 4 1

180	185	190
His Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Met Arg Lys Pro Asn		
195	200	205
Tyr Ser Trp Leu Trp Glu Asp Gly Thr Pro Leu Thr Pro His Leu Phe		
210	215	220
Arg Ile Gln Gly Ala Val Ser Arg Met Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala		
225	230	235
Tyr Ile Gln Arg Gly Thr Val Phe Ala Glu Asn Cys Ile Leu Thr Ala		
245	250	255
Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Leu Arg Ala Gln		
260	265	270

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(27)

1 6 / 4 1

&lt;400&gt; 5

ggggatcctg attcataaa gaaacag

27

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(28)

&lt;400&gt; 6

gcggatcctg tgctctcaat agattcgc

28

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1459

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

17 / 41

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Vector DNA of  
pCd51neg1 containing genomic DNA comprising exons  
encoding a Fc region of human immunoglobulin IgG1

&lt;400&gt; 7

ctcgagatcc attgtgctct aaaggagata cccggccaga caccctcacc tgcggtgccc 60  
agtgcccag gctgaggcaa gagaaggcca gaaaccatgc ccatggggtc tctgcaaccg 120  
ctggccacct tgtacctgct ggggatgctg gtcgcttcg tgctagcgga tcccgagggt 180  
gagtactaag cttcagegct cctgcctgga cgcaccccg ctatgcagcc ccagtccagg 240  
gcagcaaggc aggccccgtc tgccctctca cccggagcct ctgcccgcgc cactcatgct 300  
caggagagg gtctttctggc tttttcccag gctctgggca ggcacaggct aggtgcccct 360  
aaccaggcc ctgcacacaa aggggcagggt gctgggctca gacctgcaa gagccatata 420  
cgaggaggacc ctgcccctga cctaagccca ccccaaaggc caaactctcc actccctcag 480  
ctcggacacc ttctctctcc ccagattcca gtaactccca atcttctctc tgcagagccc 540  
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccc cctgcccag gtaagccagc ccaggcctcg 600  
ccctccagct caaggcggga cagggtgccct agagtagcct gcatccaggg acaggcccca 660  
gccgggtgct gacacgtcca cctccatctc ttctcagca cctgaactcc tgggggggacc 720  
gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga 780  
gtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta 840  
cgtggacggc gtggagggtc ataatgccc gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 900  
cacgtaccgg gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga 960  
gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa 1020  
agccaaaggt gggaccctg ggggtgcgagg gccacatgga cagaggccgg ctcggcccac 1080  
cctctgcct gagagtgacc gctgtaccaa cctctgtcct acagggcagc cccgagaacc 1140

1 8 / 4 1

acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac 1200  
 ctgcctggte aaaggcttct atcccagega catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1260  
 gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacgget ctttcttcct 1320  
 ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc 1380  
 cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg 1440  
 taaatgagtg cgacggccg 1459

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
 synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(27)

&lt;400&gt; 8

atgacttttg atgacctaaa gatccag

27

&lt;210&gt; 9

1 9 / 4 1

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(24)

&lt;400&gt; 9

cactgtgctc ttaggtttgc cttc

24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1514

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryctolagus cuniculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;220&gt;

2 0 / 4 1

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (30)..(866)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (867)..(1514)

&lt;400&gt; 10

tttcactgct tccatctctc gttcttggc atg aat ttg gaa atg gct gtt gac 53

Met Asn Leu Glu Met Ala Val Asp

1

5

gac ctc aag gtc aag ccc atg aag gac cag cct gat cag aag tcg aat 101

Asp Leu Lys Val Lys Pro Met Lys Asp Gln Pro Asp Gln Lys Ser Asn

10

15

20

ggg aag aaa cct aaa ggt ctc cgt ttt ctt tct tct ccg tgg tgg tgc 149

Gly Lys Lys Pro Lys Gly Leu Arg Phe Leu Ser Ser Pro Trp Trp Cys

25

30

35

40

cca gct gct gtg gct ctc gga gtc ctt tgc ctg gga tca ctg atg acc 197

Pro Ala Ala Val Ala Leu Gly Val Leu Cys Leu Gly Ser Leu Met Thr

45

50

55

att ata atg ctg ggg atg caa tta ttg cag gta tct gac ctc cta aag 245

Ile Ile Met Leu Gly Met Gln Leu Leu Gln Val Ser Asp Leu Leu Lys

2 1 / 4 1

60	65	70	
caa cag caa gca aac ctc act ctg cag gag aat ata ctg gag gga cag			293
Gln Gln Gln Ala Asn Leu Thr Leu Gln Glu Asn Ile Leu Glu Gly Gln			
75	80	85	
gtc tta gcc cag cag cag gca gaa gca gct tcc cag gag tca caa agg			341
Val Leu Ala Gln Gln Gln Ala Glu Ala Ala Ser Gln Glu Ser Gln Arg			
90	95	100	
gaa ctc aaa gaa atg ata gaa act ctt gcc aag agg ctg gat gaa aaa			389
Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala Lys Arg Leu Asp Glu Lys			
105	110	115	120
tcc aaa aag caa atg gaa ctt aac cat cag tac ctg aat ctc caa gag			437
Ser Lys Lys Gln Met Glu Leu Asn His Gln Tyr Leu Asn Leu Gln Glu			
125	130	135	
gct ctg aag aga atg gac aac ttt tca ggt cct tgt ccc gaa gac tgg			485
Ala Leu Lys Arg Met Asp Asn Phe Ser Gly Pro Cys Pro Glu Asp Trp			
140	145	150	
ctc tgg cat gga aaa aac tgt tat ctg ttt tcc tct gga tca ttt aat			533
Leu Trp His Gly Lys Asn Cys Tyr Leu Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn			
155	160	165	

2 2 / 4 1

tgg gaa agt agt caa gag aaa tgc ttg tct ttg gat gcc cag tta ttg 581

Trp Glu Ser Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser Leu Asp Ala Gln Leu Leu

170

175

180

aaa att aac agc aca gaa gat ctg ggc ttc atc cag caa gcg act tcc 629

Lys Ile Asn Ser Thr Glu Asp Leu Gly Phe Ile Gln Gln Ala Thr Ser

185

190

195

200

cat tcc agc ttc cca ttc tgg atg gga ttg tct cgg agg aaa ccc gac 677

His Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Arg Arg Lys Pro Asp

205

210

215

tac tca tgg ctc tgg gaa gac ggt tct cct ctg atg ccc cac ttg ttc 725

Tyr Ser Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Met Pro His Leu Phe

220

225

230

aga ttc cag ggt gct gtt tcc cag agg tac cct tca ggc acc tgt gca 773

Arg Phe Gln Gly Ala Val Ser Gln Arg Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala

235

240

245

tat ata cag aag gga aat gtt ttt gct gag aac tgc att tta gtt gca 821

Tyr Ile Gln Lys Gly Asn Val Phe Ala Glu Asn Cys Ile Leu Val Ala

250

255

260

tac agt atc tgt cag aag aag gca aat ctg ctg aga tca gag tga 866

Tyr Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Leu Arg Ser Glu

2 3 / 4 1

265

270

275

atttgaaggc tctggaagaa aagaaagtca atgaacttta ttcaggaatg taagctactc 926

cttgtgacgt aggtgcgaac tctgagagtc ctgagagctg ctcaactcct tatcagaggc 986

aaagacgggg gatccagctg cctgatacct ttgtagcaaa agggtttttt tttcccccac 1046

ctttctatct gtcagtatct atcatctatt gacctaccta catctgtcac ctatctacat 1106

ctattattta tttatcttta tctcattatc tatctatctg tccccaacac cettctctct 1166

tgttcaacca gctgtttcca agcctctgcc agcctcagt ggcacttccc ttttgtatct 1226

aaaatctgac tcttccccaa gctccggagc ccacttcaact cagtcttgte tacctcagtg 1286

cgccttcctt gcatgcagac aacacagaga acttgcccaa ctgcaagcag aaagcagaaa 1346

aggagaacta cacatgggaa actgcaacgt gaagaaacag aggaaagatc acactgatca 1406

aactgaaaac aagcgtgcgt tctccacttt aaaatcattg ctgcttggtc tttgtaattg 1466

cagtccatgt ccagactcct gcatgcgcgt gcacacacac acacacac 1514

2 4 / 4 1

&lt;211&gt; 278

&lt;212&gt; PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

&lt;400&gt; 11

Met Asn Leu Glu Met Ala Val Asp Asp Leu Lys Val Lys Pro Met Lys

1 5 10 15

Asp Gln Pro Asp Gln Lys Ser Asn Gly Lys Lys Pro Lys Gly Leu Arg

20 25 30

Phe Leu Ser Ser Pro Trp Trp Cys Pro Ala Ala Val Ala Leu Gly Val

35 40 45

Leu Cys Leu Gly Ser Leu Met Thr Ile Ile Met Leu Gly Met Gln Leu

50 55 60

Leu Gln Val Ser Asp Leu Leu Lys Gln Gln Gln Ala Asn Leu Thr Leu

65 70 75 80

Gln Glu Asn Ile Leu Glu Gly Gln Val Leu Ala Gln Gln Gln Ala Glu

85 90 95

Ala Ala Ser Gln Glu Ser Gln Arg Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr

100 105 110

Leu Ala Lys Arg Leu Asp Glu Lys Ser Lys Lys Gln Met Glu Leu Asn

115 120 125

His Gln Tyr Leu Asn Leu Gln Glu Ala Leu Lys Arg Met Asp Asn Phe

130 135 140

Ser Gly Pro Cys Pro Glu Asp Trp Leu Trp His Gly Lys Asn Cys Tyr

145 150 155 160

Leu Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Ser Ser Gln Glu Lys Cys

2 5 / 4 1

	165		170		175										
Leu	Ser	Leu	Asp	Ala	Gln	Leu	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Thr	Glu	Asp	Leu
	180		185		190										
Gly	Phe	Ile	Gln	Gln	Ala	Thr	Ser	His	Ser	Ser	Phe	Pro	Phe	Trp	Met
	195		200		205										
Gly	Leu	Ser	Arg	Arg	Lys	Pro	Asp	Tyr	Ser	Trp	Leu	Trp	Glu	Asp	Gly
	210		215		220										
Ser	Pro	Leu	Met	Pro	His	Leu	Phe	Arg	Phe	Gln	Gly	Ala	Val	Ser	Gln
225			230		235									240	
Arg	Tyr	Pro	Ser	Gly	Thr	Cys	Ala	Tyr	Ile	Gln	Lys	Gly	Asn	Val	Phe
	245		250		255										
Ala	Glu	Asn	Cys	Ile	Leu	Val	Ala	Tyr	Ser	Ile	Cys	Gln	Lys	Lys	Ala
	260		265		270										
Asn	Leu	Leu	Arg	Ser	Glu										
	275														

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1578

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sus scrofa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1)..(44)

2 6 / 4 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (45)..(869)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (870)..(1578)

&lt;400&gt; 12

gtccttgget gctccactcc ctcattcttg gaataaatc agaa atg aca ctt gat 56

Met Thr Leu Asp

1

gac ctc aag agc aac agt atg aag gat caa cct gac gag aaa tca aat 104

Asp Leu Lys Ser Asn Ser Met Lys Asp Gln Pro Asp Glu Lys Ser Asn

5

10

15

20

gga gat aaa gct gaa ggt cct cgg agt ctt tcc act ctg cgg tgg cgc 152

Gly Asp Lys Ala Glu Gly Pro Arg Ser Leu Ser Thr Leu Arg Trp Arg

25

30

35

cct gct gcc ctg att cta ggg tta ctg tgc ctg gga tta ctg gtg acc 200

Pro Ala Ala Leu Ile Leu Gly Leu Leu Cys Leu Gly Leu Leu Val Thr

40

45

50

27 / 41

gtt ata ctg ctg ata ata cag ttg tcc cag gtg tct gat ctc ctg aag 248

Val Ile Leu Leu Ile Ile Gln Leu Ser Gln Val Ser Asp Leu Leu Lys

55

60

65

caa cag aaa gtg aaa ctt act cac cag gaa gac atc ctg gag gga cag 296

Gln Gln Lys Val Lys Leu Thr His Gln Glu Asp Ile Leu Glu Gly Gln

70

75

80

gct tta gcc cag cgc cag gcg gaa aaa tct tcc cag gag tca caa agg 344

Ala Leu Ala Gln Arg Gln Ala Glu Lys Ser Ser Gln Glu Ser Gln Arg

85

90

95

100

gaa ctc aca gaa atg ata gaa act ctt gcc cac aaa ttg gat gaa aaa 392

Glu Leu Thr Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala His Lys Leu Asp Glu Lys

105

110

115

tcc aag aaa ctg atg gag ctt caa cag cag aac ttg aat ctt caa aaa 440

Ser Lys Lys Leu Met Glu Leu Gln Gln Gln Asn Leu Asn Leu Gln Lys

120

125

130

gct ctg gag aaa gcg gca aac ttt tca ggt cct tgt ccc caa gac tgg 488

Ala Leu Glu Lys Ala Ala Asn Phe Ser Gly Pro Cys Pro Gln Asp Trp

135

140

145

ctc tgg cat gaa gaa aac tgt tac aaa ttt tcc tct ggc cca ttt agt 536

Leu Trp His Glu Glu Asn Cys Tyr Lys Phe Ser Ser Gly Pro Phe Ser

28 / 41

150	155	160	
tgg gaa aaa agc cgg gag aac tgc ttg tct ttg gat gcc caa ctg ctg	584		
Trp Glu Lys Ser Arg Glu Asn Cys Leu Ser Leu Asp Ala Gln Leu Leu			
165	170	175	180
aag att aat agc aca gac gat ctg gaa ttc atc cag caa acc atc gcc	632		
Lys Ile Asn Ser Thr Asp Asp Leu Glu Phe Ile Gln Gln Thr Ile Ala			
	185	190	195
cat tcc agt ttc cca ttc tgg atg ggg tta tct ctg agg aaa ccc aac	680		
His Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Leu Arg Lys Pro Asn			
	200	205	210
aac tca tgg ctc tgg gag gac ggt act cct ttg atg ccc cac ttg ttt	728		
Asn Ser Trp Leu Trp Glu Asp Gly Thr Pro Leu Met Pro His Leu Phe			
	215	220	225
aga ctc cag gga gct gct tcc caa atg tat cct tca ggc acc tgt gcg	776		
Arg Leu Gln Gly Ala Ala Ser Gln Met Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala			
	230	235	240
tat ata cac agg gga att gtt ttt gct gaa aac tgc att tta aat gca	824		
Tyr Ile His Arg Gly Ile Val Phe Ala Glu Asn Cys Ile Leu Asn Ala			
245	250	255	260

29 / 41

ttc agt ata tgt cag aag agg gcg aat ctc ttg aga gca cag tga 869

Phe Ser Ile Cys Gln Lys Arg Ala Asn Leu Leu Arg Ala Gln

265

270

275

atttgaaagc ttggaagaa aaggagaaga tctttggatt cttttctgga atttaagcta 929

tacttggtca cttaagtga aaccatgaaa gccctgacaa ctgcctgttg ctctatgagt 989

gcagaactcc ttagcagaga ctgggcctca gctacctgac agcttggtta tcaatagttt 1049

taattctatc cctttctctc tgtgttcct agcgtgtccc aagccccct gcctgccatc 1109

agttaagtcc ctttctgtt tctattatt ctaagaactt gttgcttaat gcaaggctcg 1169

aaaatttttt ctcctttggt ttctcctagg cattttatag tttctgattt tacatagaaa 1229

cgtataattt attttgggtt aatccgtaag ccatgtttgg atgtaccgaa gtgtttttat 1289

tccccactt ggctactcaa ttgttttcac aatatttggt gaacagtga ttattttttt 1349

cactatggct gtctttgcac tttgtcaac aattattgat acatgcctgg gtctgtttct 1409

gaactctctc ttctgtttcc tttatctatt ctatactctt tgttacagca ccaccatggt 1469

atttttttcc caattttaaa agttttattg aaatatagtt gatttacaat gttgtgagaa 1529

3 0 / 4 1

ttttctctgt acaacaaagt gattcaggtc gageggcccg atatgcttc

1578

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa

&lt;400&gt; 13

Met Thr Leu Asp Asp Leu Lys Ser Asn Ser Met Lys Asp Gln Pro Asp

1 5 10 15

Glu Lys Ser Asn Gly Asp Lys Ala Glu Gly Pro Arg Ser Leu Ser Thr

20 25 30

Leu Arg Trp Arg Pro Ala Ala Leu Ile Leu Gly Leu Leu Cys Leu Gly

35 40 45

Leu Leu Val Thr Val Ile Leu Leu Ile Ile Gln Leu Ser Gln Val Ser

50 55 60

Asp Leu Leu Lys Gln Gln Lys Val Lys Leu Thr His Gln Glu Asp Ile

65 70 75 80

Leu Glu Gly Gln Ala Leu Ala Gln Arg Gln Ala Glu Lys Ser Ser Gln

85 90 95

Glu Ser Gln Arg Glu Leu Thr Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala His Lys

100 105 110

Leu Asp Glu Lys Ser Lys Lys Leu Met Glu Leu Gln Gln Gln Asn Leu

115 120 125

Asn Leu Gln Lys Ala Leu Glu Lys Ala Ala Asn Phe Ser Gly Pro Cys

3 1 / 4 1

130	135	140																	
Pro	Gln	Asp	Trp	Leu	Trp	His	Glu	Glu	Asn	Cys	Tyr	Lys	Phe	Ser	Ser				
145		150							155					160					
Gly	Pro	Phe	Ser	Trp	Glu	Lys	Ser	Arg	Glu	Asn	Cys	Leu	Ser	Leu	Asp				
		165							170					175					
Ala	Gln	Leu	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Thr	Asp	Asp	Leu	Glu	Phe	Ile	Gln				
		180							185					190					
Gln	Thr	Ile	Ala	His	Ser	Ser	Phe	Pro	Phe	Trp	Met	Gly	Leu	Ser	Leu				
		195							200					205					
Arg	Lys	Pro	Asn	Asn	Ser	Trp	Leu	Trp	Glu	Asp	Gly	Thr	Pro	Leu	Met				
		210							215					220					
Pro	His	Leu	Phe	Arg	Leu	Gln	Gly	Ala	Ala	Ser	Gln	Met	Tyr	Pro	Ser				
225				230					235					240					
Gly	Thr	Cys	Ala	Tyr	Ile	His	Arg	Gly	Ile	Val	Phe	Ala	Glu	Asn	Cys				
				245					250					255					
Ile	Leu	Asn	Ala	Phe	Ser	Ile	Cys	Gln	Lys	Arg	Ala	Asn	Leu	Leu	Arg				
		260							265					270					
Ala	Gln																		

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 3750

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

3 2 / 4 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1)..(91)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (92)..(1186)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (1187)..(3750)

&lt;400&gt; 14

atttaaactg catcagaagc tcgagcactg gcagttggct gactgaggtc ctctactgtt 60

tcagtttccc attcttggca tgaatttgga a atg gct ttt gat gac aag atg 112

Met Ala Phe Asp Asp Lys Met

1

5

aag cct gtg aat ggc cag cct gat cag aag tca tgt ggc aag aag cct 160

Lys Pro Val Asn Gly Gln Pro Asp Gln Lys Ser Cys Gly Lys Lys Pro

10

15

20

aaa ggg ctg cat ttg ctt tct tcc aca tgg tgg tgc cct gct gct gtg 208

Lys Gly Leu His Leu Leu Ser Ser Thr Trp Trp Cys Pro Ala Ala Val

25

30

35

3 3 / 4 1

act ctg gcc atc ctt tgc cta gtg tta tca gtg acc ctt att gta cag 256  
 Thr Leu Ala Ile Leu Cys Leu Val Leu Ser Val Thr Leu Ile Val Gln  
 40 45 50 55

cag aca cag tta ctc cag gta tct gac ctc cta aag caa tac caa gca 304  
 Gln Thr Gln Leu Leu Gln Val Ser Asp Leu Leu Lys Gln Tyr Gln Ala  
 60 65 70

aac ctt act cag cag gat cat atc ctg gag ggg cag atg tca gcc cag 352  
 Asn Leu Thr Gln Gln Asp His Ile Leu Glu Gly Gln Met Ser Ala Gln  
 75 80 85

aag aaa gca gaa aat gct tca caa gaa tca aag agg gaa ctg aag gaa 400  
 Lys Lys Ala Glu Asn Ala Ser Gln Glu Ser Lys Arg Glu Leu Lys Glu  
 90 95 100

cag ata gac acc ctc acc tgg aag cta aac gag aaa tcc aaa gag cag 448  
 Gln Ile Asp Thr Leu Thr Trp Lys Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln  
 105 110 115

gag aag ctt ctg cag cag aat cag aac ctc caa gaa gcc ctg cag aga 496  
 Glu Lys Leu Leu Gln Gln Asn Gln Asn Leu Gln Glu Ala Leu Gln Arg  
 120 125 130 135

gct gtg aac gct tca gag gag tcc aag tgg gaa ctg aag gaa caa ata 544

3 4 / 4 1

Ala Val Asn Ala Ser Glu Glu Ser Lys Trp Glu Leu Lys Glu Gln Ile

140

145

150

gac att ctc aac tgg aag ctg aat ggg ata tcc aaa gag cag aag gag 592

Asp Ile Leu Asn Trp Lys Leu Asn Gly Ile Ser Lys Glu Gln Lys Glu

155

160

165

ctt ctg cag cag aat cag aac ctc caa gaa gcc ctg cag aaa gct gag 640

Leu Leu Gln Gln Asn Gln Asn Leu Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Glu

170

175

180

aaa tat tca gag gag tcc cag aga gaa ctg aag gaa cag ata gac acc 688

Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Gln Arg Glu Leu Lys Glu Gln Ile Asp Thr

185

190

195

ctc agc tgg aag cta aac gag aaa tcc aaa gag cag gag gag ctt ctg 736

Leu Ser Trp Lys Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Glu Glu Leu Leu

200

205

210

215

cag cag aat cag aat ctt caa gaa gcc ctg cag aga gct gca aac tct 784

Gln Gln Asn Gln Asn Leu Gln Glu Ala Leu Gln Arg Ala Ala Asn Ser

220

225

230

tca ggt cct tgt cca caa gac tgg atc tgg cat aaa gaa aac tgt tac 832

Ser Gly Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Lys Glu Asn Cys Tyr

235

240

245

3 5 / 4 1

ctc ttc cat ggg ccc ttt aac tgg gaa aaa agt cgg gag aat tgc cta	880
Leu Phe His Gly Pro Phe Asn Trp Glu Lys Ser Arg Glu Asn Cys Leu	
250 255 260	
tct tta gat gcc cag tta cta caa att agt acc aca gat gat ctg aac	928
Ser Leu Asp Ala Gln Leu Leu Gln Ile Ser Thr Thr Asp Asp Leu Asn	
265 270 275	
ttc gtc tta caa gca act tcc cat tcc acc tcc cca ttt tgg atg gga	976
Phe Val Leu Gln Ala Thr Ser His Ser Thr Ser Pro Phe Trp Met Gly	
280 285 290 295	
tta cat cgg aaa aat ccc aac cac cca tgg cta tgg gag aac ggc tct	1024
Leu His Arg Lys Asn Pro Asn His Pro Trp Leu Trp Glu Asn Gly Ser	
300 305 310	
cct ttg agt ttt caa ttc ttt agg acc agg ggc gtt tct tta cag atg	1072
Pro Leu Ser Phe Gln Phe Phe Arg Thr Arg Gly Val Ser Leu Gln Met	
315 320 325	
tac tca tca ggc acc tgt gca tat att caa gga gga gtt gtg ttt gct	1120
Tyr Ser Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Gly Gly Val Val Phe Ala	
330 335 340	
gaa aac tgc att tta act gca ttc agc ata tgt cag aag aag gca aat	1168

3 6 / 4 1

Glu Asn Cys Ile Leu Thr Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn

345

350

355

tta ttg cta act cag tga aactaaggat tctggagaag aacaggagaa 1216

Leu Leu Leu Thr Gln

360

365

gacctttaac tgttgttttg aaatttaagc tatectttct tgggtgtaaa acatgtggcc 1276

ttgacagctg tcagttactt tetaactgca gttcacctca acagagacaa agaccagaag 1336

caaaaaccgc ggggtccagc tgatggcatc tttgtatcaa aagttgtgaa ttcaattggt 1396

tatccatgta cactggcccc gccctccca agactcccaa ccaacctgca atcctttttt 1456

tctttcttgt tttaaactat gcctcctgtc tgacctgggg gatgctttct gctcaatttc 1516

ctctacctca ggtatgcctt ctgttgctgc atgaaagaca gaatgtagaa aaccttcttc 1576

aagtgcaggc agagagctca aagttaaaaa catgcctaag aaatagcatg caaagaaaca 1636

gaactggaaa agctacactg tacgcaggag ctcattgtct ctaaaaagct atggcttgat 1696

cttcacgact tgggtccatc tccagactgc accatttaca catttatggt tttttatttt 1756

atttttattg tgtgtttatg gatagttggc ctatatgtat ctctgtgtac cacatgagtg 1816

3 7 / 4 1

tctccattca gaagagggca tcagattctc tgaaactgga actgcagatg gctgtaagct 1876

actacataga tgtaaagaat tgaattcatg tectctgaaa gaacagtcag tactcttaac 1936

catgaactat ttctccaggt cccgtgatca ttctctgtat cagctatttc ttcacatttg 1996

ctctacccaaa gaacagagct taaaacagta ttttataaag ccatagaata tggccccaaa 2056

acaaaactag aatTTTTccc ttaaattgca tactttgtag acagtctctc cttgaccctg 2116

ccatgccatg ctatgactta gaaacataca tgaccaaaat ggatgaaact cagttgaaga 2176

acaagttctt agaatcacct gagctgggta taaaaatatt gttctatggg aacagatgga 2236

tttagaaata tctattatca gggcctccac catccccaca agtcacagac tcttccattt 2296

caaaggaage ttccattat gctagaggta atatagcata tatgtcatgt atatgagtgt 2356

gtatttgtgt gtgtgagtgt gtgtgttcat atgctagata cgtccttgag aagatgagac 2416

attggcagct ttgtgtgtaa tgaatttgca ataatccaaa ttgtgaagta gtttccatgg 2476

ttccttatag tgatgacatc accacagcca agatgatgag catacctgtt gtttctgccc 2536

ctttccaatg ctctctccct agaacaaaca ccaatctgtt gtcagttgtc atttcataga 2596

38 / 41

gtttataatc ttgttttttaa gagagaatct cattatatag ttctgactgc cctgggactc 2656

actacacaga ccagcctggc ctccaccttc cagagttcct cctgcctttg actcacaagt 2716

gctaacactg aaggagtgca ccgccatgta tggtcatgc agtttatgtg aatggaatag 2776

tataacacat ccagattttc tcagttcagt ttcttcact tgggtctatt attttggat 2836

tcatacatct ctgcctcagt gtttgatca gttcttcaat ttttttaaaa tgttgatcat 2896

tcccctgggtg ggtacatatt gtcattttta tctgtgtatt tgttgatgac atttgggttg 2956

tttttgtttg gggtcacctt caaataaagc tgctatgaat gcccatggac gattctgggt 3016

tctcatgtaa gcacctctga gtgtgacact tgggtcattc agtgtgtgaa tatatgggtg 3076

gccatgttaa ccattgcttt ttgaaatttc caattttttt taaaattagt cgactttaca 3136

tetcaactcc aatttccttc cctcctctcc tetcaatctt caccacctc cctctctac 3196

ccccatccac tcttcccttt ctcttcagaa aagaggaggc ttccacaga tgtcaaccag 3256

ccttagcgta tcaagttgca gtaagaatag gtttatcacc ttctatgaaa gccttaattt 3316

ttagacttat cactgtatat gcagtatttt gtttgcattg atgtattggg accacatata 3376

3 9 / 4 1

tgcctaatac cagaggaagt cagaagaggg catggtatct tctgagactg gaattacaga 3436

catttttgag ccatacctaca gactctggaa attgaacceca ggatttctgg aaagtttaggc 3496

agtgccttta acccctgaac catctcttca ggcctatag caatctttat tgatatgtaa 3556

ctgtgtataa ttgcactttt agtttgaagt tcttaaattgg caaatagtct tgaatttatt 3616

ttcatgttat catttactgt ctgtacattt tctgtaatga aataactaag catatctttt 3676

gagaatttta ttttcttaca ttttaaattct gaaggattta catacatact ggagaataaa 3736

aacagcctaa tgtg 3750

<210> 15

<211> 364

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 15

Met Ala Phe Asp Asp Lys Met Lys Pro Val Asn Gly Gln Pro Asp Gln

1

5

10

15

Lys Ser Cys Gly Lys Lys Pro Lys Gly Leu His Leu Leu Ser Ser Thr

20

25

30

4 0 / 4 1

Trp Trp Cys Pro Ala Ala Val Thr Leu Ala Ile Leu Cys Leu Val Leu  
 35 40 45  
 Ser Val Thr Leu Ile Val Gln Gln Thr Gln Leu Leu Gln Val Ser Asp  
 50 55 60  
 Leu Leu Lys Gln Tyr Gln Ala Asn Leu Thr Gln Gln Asp His Ile Leu  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Gln Met Ser Ala Gln Lys Lys Ala Glu Asn Ala Ser Gln Glu  
 85 90 95  
 Ser Lys Arg Glu Leu Lys Glu Gln Ile Asp Thr Leu Thr Trp Lys Leu  
 100 105 110  
 Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Glu Lys Leu Leu Gln Gln Asn Gln Asn  
 115 120 125  
 Leu Gln Glu Ala Leu Gln Arg Ala Val Asn Ala Ser Glu Glu Ser Lys  
 130 135 140  
 Trp Glu Leu Lys Glu Gln Ile Asp Ile Leu Asn Trp Lys Leu Asn Gly  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Lys Glu Gln Lys Glu Leu Leu Gln Gln Asn Gln Asn Leu Gln  
 165 170 175  
 Glu Ala Leu Gln Lys Ala Glu Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Gln Arg Glu  
 180 185 190  
 Leu Lys Glu Gln Ile Asp Thr Leu Ser Trp Lys Leu Asn Glu Lys Ser  
 195 200 205  
 Lys Glu Gln Glu Glu Leu Leu Gln Gln Asn Gln Asn Leu Gln Glu Ala  
 210 215 220  
 Leu Gln Arg Ala Ala Asn Ser Ser Gly Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile  
 225 230 235 240

4 1 / 4 1

Trp His Lys Glu Asn Cys Tyr Leu Phe His Gly Pro Phe Asn Trp Glu  
245 250 255

Lys Ser Arg Glu Asn Cys Leu Ser Leu Asp Ala Gln Leu Leu Gln Ile  
260 265 270

Ser Thr Thr Asp Asp Leu Asn Phe Val Leu Gln Ala Thr Ser His Ser  
275 280 285

Thr Ser Pro Phe Trp Met Gly Leu His Arg Lys Asn Pro Asn His Pro  
290 295 300

Trp Leu Trp Glu Asn Gly Ser Pro Leu Ser Phe Gln Phe Phe Arg Thr  
305 310 315 320

Arg Gly Val Ser Leu Gln Met Tyr Ser Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile  
325 330 335

Gln Gly Gly Val Val Phe Ala Glu Asn Cys Ile Leu Thr Ala Phe Ser  
340 345 350

Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Leu Leu Thr Gln  
355 360

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01636

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/28, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P43/00, A61P9/10, A61P7/02, A61P7/04, A61P13/12, A61P9/10,  
A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/28, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 99/32520, A (Japan Tobacco Inc.), 01 July, 1999 (01.07.99), Claims; pages 29 to 45 & EP, 1046652, A & AU, 9916841, A	1-30
P, X	JP, 2000-109435, A (Japan Tobacco Inc.), 18 April, 2000 (18.04.00), Claims; Par. Nos. [0029] to [0051] (Family: none)	1-30
Y	WO, 96/17058, A (Nippon Chemiphar Co.), 06 June, 1996 (06.06.96), Claim, & JP, 9-98787, A & EP, 795605, A & AU, 9539939, A & US, 5962260, A	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
28 May, 2001 (28.05.01)

Date of mailing of the international search report  
12 June, 2001 (12.06.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01636

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 464533, A (Behringwerke AG, Gen Hospital Corporation, Hoechst AG), 08 January, 1992 (08.01.92), Claim, & JP, 5-247094, A & AU, 9179357, A & CA, 2045869, A & DE, 59109032, A & KR, 249572, B	1-30
A	Tatsuya S. et al., "An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein", Nature, Vol.386, (1997), pages 73 to 77	1-30

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09、C12N1/21、C12N5/10、C07K16/28、C12P21/08、A61K39/395、A61P43/00、A61P9/10、  
A61P7/02、A61P7/04、A61P13/12、A61P9/10、A61P29/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09、C12N1/21、C12N5/10、C07K16/28、C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 99/32520, A (日本たばこ産業株式会社) 1.7月.1999 (01.07.99) 請求の範囲、第29頁—第45頁 &EP, 1046652, A、&AU, 9916841, A	1-30
P, X	JP, 2000-109435, A (日本たばこ産業株式会社) 18.4月.2000 (18.04.00) 特許請求の範囲、段落[0029]—[0051] (ファミリーなし)	1-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.05.01

国際調査報告の発送日

12.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

甲斐 順子

4N

9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 96/17058, A (NIPPON CHEMIPHAR CO) 6. 6月. 1996 (06. 06. 96) Claim, &JP, 9-98787, A、 &EP, 795605, A、 &AU, 9539939, A、 &US, 5962260, A	1-30
Y	EP, 464533, A (BEHRINGWERKE AG; GEN HOSPITAL CORP; HOECHST AG) 8. 1月. 1992 (08. 01. 92) Claim、 &JP, 5-247094, A、 &AU, 9179357, A、 &CA, 2045869, A、 &DE, 59109032, A、 &KR, 249572, B	1-30
A	Tatsuya S. et al., "An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein" Nature, Vol. 386, (1997), pp. 73-77	1-30